

IDENTIFICACIÓN DE QTLS ASOCIADOS A CARACTERÍSTICAS AGRONOMICAS DE INTERES, EN UNA RETROCRUZA AVANZADA DE FRIJOL COMUN (*Phaseolus vulgaris*)

ROCIO DEL PILAR BARRIOS MENDEZ

Trabajo de grado

Presentado como requisito parcial

Para optar el titulo de

BIOLOGA

UNIVERSIDAD DEL TOLIMA

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE BIOLOGIA

Ibagué-Tolima

2011

IDENTIFICACIÓN DE QTLs ASOCIADOS A CARACTERÍSTICAS AGRONOMICAS DE INTERES, EN UNA RETROCRUZA AVANZADA DE FRIJOL COMUN (*Phaseolus vulgaris*)

ROCIO DEL PILAR BARRIOS MENDEZ

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de
Bióloga**

DIRECTOR

MATTHEW W. BLAIR

Ph. D. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)

CODIRECTOR

GUSTAVO ADOLFO VALLEJO

Ph.D. Universidad del Tolima

UNIVERSIDAD DEL TOLIMA

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE BIOLOGIA

Ibagué-Tolima

2011

ADVERTENCIA

La Facultad de Ciencias básicas de la Universidad del Tolima, el director y codirector del trabajo y el jurado calificador, no son responsables de los conceptos ni ideas expuestas por el autor en el presente trabajo.

Artículo 16, acuerdo 032 de 1976 y artículo 29, acuerdo 064 de 1991, consejo académico de la Universidad del Tolima

NOTA DE ACEPTACION

El trabajo de grado titulado “**IDENTIFICACIÓN DE QTLS ASOCIADOS A CARACTERÍSTICAS AGRONOMICAS DE INTERES, EN UNA RETROCRUZA AVANZADA DE FRIJOL COMUN (*Phaseolus vulgaris*)**”, presentado por la estudiante Rocío del Pilar Barrios Méndez, Para optar el título de Bióloga, fue revisado y calificado como:

APROBADO

DIRECTOR

Mathew W. Blair Ph.D

Especialista en germoplasma
LCGF-CIAT

CODIRECTOR

Gustavo Adolfo Vallejo

Ph.D. Universidad del Tolima
Laboratorio de Investigación en Parasitología Tropical (LIIPT)

A mis Padres y Hermanito,
Quienes me han brindado su apoyo, amor
y me enseñaron desde pequeña a luchar para
alcanzar mis metas
Doy gracias a Dios por tener esta gran familia

A Paulo quien me brindó su amor,
su cariño, su estímulo y su apoyo
constante en estos años de mi vida
¡Muchísimas Gracias!

Mi triunfo es de ustedes

¡LOS AMO!

AGRADECIMIENTOS

Dr. Mathew Blair, quien me brindo la oportunidad de realizar este grandioso trabajo en su grupo de investigación.

Hector Fabio Buendia y Agobardo Hoyos, quienes me brindaron su conocimiento y su ayuda constante durante la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros del Laboratorio quienes fuera de su apoyo profesional me brindaron su gran amistad.

A todos los muchachos de campo quienes me apoyaron en todas las actividades e inquietudes oportunamente.

RESUMEN

El fríjol es una leguminosa cuyo grano es una fuente de alimentación proteica de gran importancia en la dieta alimenticia de la población mundial, pero en los últimos años se ha presentado un déficit en su producción debido al deterioro del cultivo observado en el campo, el cual trae consigo un desestimulo por sembrar. La necesidad de aumentar la producción agrícola, ha llevado a los mejoradores de plantas a un uso racional de los recursos genéticos; de manera que se maximice la producción sin afectar la diversidad de las plantas y se disminuya la escala de erosión genética. Por esta razón, diversos proyectos de mejoramiento genético buscan optimizar características agronómicas asociadas a componentes de rendimiento mediante la introgresión de características de interés de materiales silvestres en materiales cultivados. En el siguiente trabajo, se utilizó una retrocruza (RC2F2:5) originada entre un material cultivar Colombiano denominado Radical cerinza y una accesión silvestre llamada G24390. Se utilizaron marcadores del tipo microsatélites para construir un mapa genético, y así identificar posibles QTLs asociados a características agronómicas de interés relacionadas con características agronómicas asociada a rendimiento. Se obtuvo como resultado, un mapa genético con una longitud total de 350.44 cM, en el cual se establecieron los 11 grupos de ligamiento reportados para frijol, con una longitud promedio de 32.60 cM y una distancia promedio entre marcadores de 5.97cM, posteriormente, se hallaron un total de 9 QTLs para las características fenotípicas evaluadas por medio del análisis por intervalo compuesto, entre los que se resalta el QTL REND4,2 asociado a la característica rendimiento en la localidad de Popayán que explica una variabilidad fenotípica del 21% atribuida al padre silvestre G24390, demostrando la importancia de la introgresión de características de importancia de accesiones silvestres en líneas elites, para mejorar características de interés.

Palabras clave: Frijol, Producción, Retrocruza, Cultivar, Silvestre, microsatélites, QTLs.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 GENERALIDADES DEL CULTIVO	4
2.1.1 Taxonomía	4
2.2 MORFOLOGÍA	4
2.2.1 Sistema radicular	5
2.2.2 Tallo principal	5
2.2.3 Hoja	6
2.2.4 Flor	6
2.2.5 Fruto	7
2.3 ORIGEN Y DOMESTICACIÓN DEL FRIJOL COMÚN	8
2.4. IMPORTANCIA DEL FRIJOL COMUN	9
2.5 PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE FRIJOL COMÚN	10
2.5.1 Producción mundial de frijol	10
2.5.2 Producción de frijol en Colombia	11
2.5.3 Problemas en la producción de frijol	11
2.6 FITOMEJORAMIENTO	12
2.6.1 Mejoramiento genético de frijol	13
2.6.2 Retrocruza	13

2.7	MARCADORES GENÉTICOS	15
2.7.1	Marcadores morfológicos	15
2.7.2	Marcadores bioquímicos o isoenzimas	16
2.7.3	Marcadores de ADN	16
2.7.3.1	Microsatélites	17
2.8	MAPAS DE LIGAMIENTO	18
2.8.1	Requerimientos para el mapeo genético	19
2.8.2	Selección de marcadores moleculares	20
2.8.3	Análisis de ligamiento de los marcadores	20
2.8.4	Grupos de ligamiento	21
2.8.5	Distancias genéticas y Funciones de Mapeo	21
2.8.6	Mapas de ligamiento en frijol	21
2.9	LOCI DE CARACTERÍSTICAS CUANTITATIVAS (QTL)	23
2.9.1	Análisis de QTLs	24
2.9.2	QTLs asociados a características de rendimiento frijol	26
2.10	LIBRERÍAS DE LÍNEAS DE SUSTITUCIÓN DE SEGMENTOS CROMOSÓMICOS	26
3.	JUSTIFICACIÓN	27
4.	OBJETIVOS	28
4.1	OBJETIVOS GENERALES	28

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 EVOLUCIÓN DE PARENTALES	29
5.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO	30
5.2.1 Desarrollo de la retrocruza avanzada	31
5.2.2 Datos fenotípicos	34
5.3 EXTRACCIÓN DE ADN	34
5.4 EVALUACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES	35
5.5 MAPA DE LIGAMIENTO	37
5.6 ANÁLISIS DE QTL	37
5.7 ANÁLISIS DE INTROGRESIÓN	38
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1 EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN	39
6.1.1 Rendimiento	41
6.1.2 Días a madurez	44
6.1.3 Días a floración	46
6.1.4 Peso por planta	49
6.1.5 Peso de 100 semillas	51
6.2 CORRELACIONES PARA LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	53
6.3 EVALUACIÓN PARENTAL CON MICROSATÉLITES	55
6.4 CONSTRUCCIÓN DEL MAPA DE LIGAMIENTO	57

6.5 COMPARACIÓN ENTRE EL MAPA DE LIGAMIENTO CON 276 INDIVIDUOS Y EL MAPA CON 96 INDIVIDUOS	66
6.6 DISTORSIÓN DE LA SEGREGACIÓN	68
6.7 ANÁLISIS DE QTLs	70
6.7.1 Análisis de QTLs por marcador simple	70
6.7.2 Análisis de QTL por intervalo compuesto	76
6.8 ANÁLISIS DE INTROGRESIÓN GENÉTICA	81
6.8.1 Asociación de microsatélites con las características Fenotípicas	82
6.8.1.1 Peso por planta en condiciones de sequia en la localidad de Palmira	83
6.8.1.2 Peso por planta en la localidad de Palmira	85
6.8.2 Líneas de introgresión	86
7. CONCLUSIONES	88
8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS	90
9. ANEXOS	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principales países productores de frijol 1994-2004	1
Figura 2: Flor de <i>Phaseolus vulgaris</i> .	7
Figura 3: Semillas de Radical Cerinza	30
Figura 4: Semillas de G24390	31
Figura 5: Esquema del desarrollo de la retrocruza avanzada G24390 x Radical cerinza	32
Figura 6: Histograma de Rendimiento en la localidad de Popayan	41
Figura 7: Histograma de Rendimiento en la localidad de Palmira bajo condiciones de Riego	42
Figura 8: Histograma de Rendimiento en la localidad de Palmira bajo condiciones de Riego	43
Figura 9: Histograma de días a madurez en la localidad de Popayán	44
Figura 10: Histograma de días a madurez en condiciones de sequía en la localidad de Palmira	45
Figura 11: Histograma de días a madurez en condiciones de Riego en la localidad de Palmira	45
Figura 12: Histograma de días a floración en condiciones de sequía en la localidad de Palmira	47
Figura 13: Histograma de días a floración en condiciones de riego en la localidad de Palmira	48
Figura 14: Histograma de días a floración en la localidad de Palmira.	48
Figura 15: Histograma de peso planta en la localidad de Popayán.	49
Figura 16: Histograma de peso por planta en condiciones de riego en la localidad de Palmira	50
Figura 17: Histograma de peso por planta en condiciones de sequía en la localidad de Palmira	50

Figura 18: Histograma de peso de 100 semillas en la localidad de Popayán	52
Figura 19: Histograma de peso de 100 semillas en la localidad en condiciones de sequía en la localidad de Palmira	52
Figura 20: Histograma de peso de 100 semillas en la localidad en condiciones de riego en la localidad de Palmira	53
Figura 21: Porcentaje de polimorfismo evaluado en las diferentes cruzas	56
Figura 22: Mapa de ligamiento con 276 individuos de la población G24390 X Radical cerinza	59
Figura 23: Mapa de ligamiento con 276 marcadores de la población G24390 X Radical cerinza.	60
Figura 24: Mapa de ligamiento con 276 individuos de la población G24390 X Radical cerinza	61
Figura 25: Mapa de ligamiento con 276 individuos de la población G24390 X Radical cerinza.	62
Figura 26: Mapa de ligamiento con 96 individuos de la población Radical cerinza x G24390	64
Figura 27: Mapa de ligamiento con 96 individuos de la población Radical cerinza x G24390	65
Figura 28: Mapa de ligamiento con 96 individuos de la población G24390 x Radical cerinza.	66
Figura 29: Distorsión de la segregación de los microsatélites evaluados en la población Radical cerinza x G24390	68
Figura 30: Análisis de marcador simple por medio del programa QGene v 4.0	72
Figura 31: Análisis de marcador simple por medio del programa QGene v 4.0	73
Figura 32: Análisis de marcador simple por medio del programa QGene v 4.	74
Figura 33: Analisis de QTLs por mapeo por intervalo compuesto. Grafica realizada en MapChart v.2.2.	

- Figura 34:** Análisis de QTLs por mapeo por intervalo compuesto. Grafica realizada en MapChart v.2.2 80
- Figura 35:** Numero de segmentos de introgresión por línea 82
- Figura 36:** QTL asociado al rasgo peso por planta en condiciones de sequia en la localidad de Palmira 84
- Figura 37:** QTL asociado al rasgo peso por planta Popayán 85
- Figura 38:** Líneas de segmentos de sustitución cromosómica de la población G24390 X Radical cerinza. Radical cerinza: verde; G24390: Negro; Heterocigoro: Gris; Dato perdido: azul. 87

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Escala de color de la semilla de frijol.	7
Tabla 2: Escala de tamaño de la semilla de frijol según el peso de 100 semillas.	8
Tabla 3: Parentales evaluados con microsatélites	29
Tabla 4: Condiciones geográficas y climáticas de las localidades Evaluadas	33
Tabla 5: Condiciones de la reacción de PCR	35
Tabla 6: Programa de PCR para amplificar microsatélites	36
Tabla 7: Comportamiento de las 96 líneas RC2F2:5 de la cruza Radical cerinza por G24390 evaluadas en Popayán.	39
Tabla 8: Comportamiento de las 96 líneas RC2F2:5 de la cruza Radical Cerinza por G24390 evaluadas en Palmira bajo condiciones de Riego	40
Tabla 9: Comportamiento de las 96 líneas RC2F2:5 de la cruza Radical Cerinza por G24390 evaluadas en Palmira bajo condiciones de Sequía	40
Tabla 10: Análisis de varianza para rendimiento	41
Tabla 11: Análisis de varianza de días a madurez	46
Tabla 12: Análisis de varianza de días a floración	47
Tabla 13: Análisis de varianza de peso por planta	51
Tabla 14: Análisis de varianza de peso de 100 semillas	51
Tabla 15: Correlaciones (Pearson) para las variables evaluadas en condiciones de sequía en Palmira	53
Tabla 16: Correlaciones (Pearson) para las variables evaluadas en condiciones de riego en Palmira	54
Tabla 17: Correlaciones (Pearson) para las variables fenotípicas en Popayán	55

Tabla 18: Resumen del mapa de ligamiento con 270 individuos de la población G24390 x Radical cerinza.	58
Tabla 19: Resumen del mapa de ligamiento con 96 individuos de la población G24390 x Radical cerinza	63
Tabla 20: Análisis de QTLs por intervalo compuesto	69
Tabla 21: Microsatélites con distorsión en la segregación	70
Tabla 22: Análisis de QTLs por medio de análisis de marcador simple	78
Tabla 23: Proporción genómica de la población Radical cerinza x G24390	81
Tabla 24: Marcadores asociados con características fenotípicas	83

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A	102
ANEXO B	103
ANEXO C	104
ANEXO D	105

1. INTRODUCCIÓN

El frijol es una leguminosa cuyo grano es una fuente de alimentación proteica de gran importancia en la dieta alimenticia de poblaciones de bajos recursos económicos, este grano contiene 22% de proteínas de alta digestibilidad, es un alimento de alto valor energético, contiene alrededor de 70% de carbohidratos totales y además aporta cantidades importantes de minerales (Ca, Mg, Fe), Vitaminas A, B 1-Tiamina, B2-Rivoflavina, C-ácido ascórbico, también es importante, porque al ser una leguminosa tiene la cualidad de realizar la actividad simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (*Rhizobium phaseoli*) y así contribuye gratuitamente a mejorar la fertilidad de los suelos (CIT,2006).

La producción mundial de frijol, según datos de la FAO, fue de 18.7 millones de toneladas en el año 2005. Los datos mundiales señalan que los países que concentran la producción de frijol son la India (18 por ciento), Brasil (16.5 por ciento), China (8.4 por ciento), Estados Unidos (3 por ciento) y México (6.8 por ciento) (IICA et al., 2007)

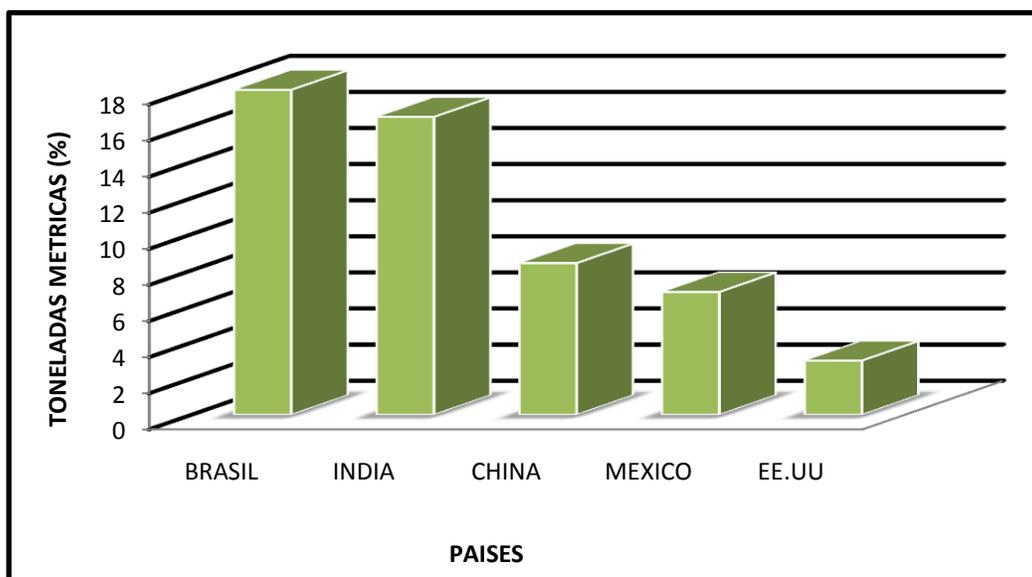


FIGURA 1: Principales países productores de frijol 1994-2004.Fuente: IICA, 2007

Según la Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO), la producción mundial de frijol en el año 2007 fue de 19.30 millones de toneladas; 0.52% menos respecto al 2006 y para el 2008 disminuyó 6.76% respecto al 2003, en promedio, mostró una disminución de 1.70% anual en este periodo (Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial, 2009).

Sin embargo, Colombia es considerada como un gran productor y consumidor de frijol, pero esta producción no es suficiente y es necesario importar para cubrir la demanda. Las mismas estadísticas muestran un avance sostenido en cuanto a producción y productividad, gracias al aporte de la tecnología, pero un descenso en la superficie sembrada durante los últimos años dado el deterioro general observado en el campo el cual trae consigo un desestimulo por sembrar cultivos tradicionales (Voysesst, 2000).

La producción de frijol es afectada por diferentes factores, tanto bióticos como abióticos, que reducen el área sembrada y los rendimientos esperados. Entre los factores bióticos, las enfermedades pueden causar enormes pérdidas en rendimiento dependiendo de las características de la población prevaleciente del patógeno, la variedad de frijol, las condiciones ambientales de la zona, y el sistema del cultivo practicado (Beebe & Pastor-Corrales, 1991). Los eventos abióticos también pueden tener profundas repercusiones económicas y sociales. (Bonilla, 2000).

La mayoría de las características heredables de importancia económica, tales como componentes de rendimiento, calidad nutricional y tolerancia a estrés, resultan de la acción conjunta de varios genes y son llamadas poligénicas, cuantitativas o de herencia compleja. Poco se sabe acerca del número, posición cromosómica, magnitud del efecto e interacciones de los loci que controlan la expresión de dichas características.

Estos loci son denominados QTL (Quantitative trait loci), es decir, loci controladores de características cuantitativas (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Estas características son afectadas también por el ambiente, que junto con las interacciones genotipo-medio ambiente reducen la eficiencia de la selección para caracteres agronómicos de importancia para un mejor rendimiento.

Los marcadores genéticos, corresponden a entidades heredables que segregan como genes individuales, que no son afectados por el ambiente, son altamente polimórficos, están asociados a rasgos de importancia económica, son usados por los mejoradores como herramientas para la selección. Para loci múltiples o QTL pueden ser efectivos si existe una asociación significativa entre un rasgo cuantitativo y el marcador genético de la característica de interés.

Estos marcadores pueden ser ubicados mediante mapeo genético, en un modelo abstracto de los arreglos lineales en los cuales están ubicados, ayudados por una herencia simple que puede ser seguida por generaciones debido a que este gen o marcador posee una variación detectable, lo que los convierte en una herramienta indispensable para el mejoramiento genético de características agronómicas de interés que mejoren el rendimiento (Liu, 1998). En el siguiente trabajo, se utilizaron marcadores del tipo microsatélites para construir un mapa genético, y así identificar posibles QTLs asociados a características agronómicas de interés relacionadas con el rendimiento

2.. MARCO TEORICO

2.1 GENERALIDADES DEL CULTIVO

2.1.1 Taxonomía

Desde el punto de vista taxonómico, el frijol es el prototipo del género *Phaseolus* y su nombre científico es *Phaseolus vulgaris* L. asignado por Lineo en 1753. Pertenece a la tribu *Phaseolae* de la subfamilia papilionoidae dentro del orden Rosales y la familia Leguminoseae.

Según CIAT (1986) El género *Phaseolus* incluye aproximadamente 150 especies, de las cuales la mayoría son silvestres y de origen americano, 52 han sido clasificadas taxonómicamente y cuatro han sido domesticadas: *P. vulgaris* L.; *P. lunatus* L.; *P. coccineus* L., y *P. acutifolius* A. Gray van latifolius Freeman.

2.2 MORFOLOGIA

Es una planta herbácea autógama de ciclo anual, que se cultiva en zonas tropicales y regiones templadas. Esta característica permite agruparla en las denominadas especies termófilas, dado que no soporta bajas temperaturas (Debouck e Hidalgo, 1985). Se distingue por ser altamente poliforme, ya que es posible distinguir variaciones fenológicas entre la misma especie de una región a otra (Romero, 1993). El ciclo vegetativo del frijol puede variar entre 80 (variedades precoces) y 180 días (variedades trepadoras). Dicho lapso se encuentra determinado sobre todo por el genotipo de la variedad, hábito de crecimiento, clima, suelo, radiación solar y fotoperíodo (Ortiz, 1998).

Los caracteres de la morfología de las especies se agrupan en caracteres constantes y caracteres variables. Los caracteres constantes son aquellos que identifican la especie o la variedad y generalmente son de alta heredabilidad. Los caracteres variables reciben la influencia de las condiciones ambientales, y podrán ser considerados como la resultante de la acción del medio ambiente sobre el genotipo (Arias *et al.*, 2007)

Entre sus principales características podemos encontrar (CIAT, 1986):

2.2.1 Sistema radicular: Es muy ligero y poco profundo y está constituido por una raíz principal y gran número de raíces secundarias con elevado grado de ramificación. La composición del sistema radical del frijol y su tamaño dependen de las características del suelo, tales como estructura, porosidad, grado de aireación, capacidad de retención de humedad, temperatura, contenido de nutrientes, etc

2.2.2 Tallo principal: Es herbáceo, en general, es una sucesión de nudos y entrenudos donde se insertan las hojas y los diversos complejos axilares (Arias, *et al.* 2007) En variedades enanas presenta un porte erguido y una altura aproximada de 30 a 40 centímetros, mientras que en frijol de enrame alcanza una altura de 2 a 3 metros, siendo voluble y dextrógiro (se enrolla alrededor de un soporte o tutor en sentido contrario a las agujas el reloj).

Cuando la planta es de hábito de crecimiento determinado el tallo posee, por lo general, un bajo número de nudos, y en las plantas de hábito de crecimiento indeterminado el número de nudos es mayor. Bajo condiciones similares de ambiente, el número de nudos del tallo de un material genéticamente puro se puede considerar como un carácter de poca variación.

- **Hábito de crecimiento:** Este concepto morfoagronómico puede ser definido como el resultado de la interacción de varios caracteres de la planta que determinan su arquitectura final. Debido a que algunos de estos caracteres son influenciados por el ambiente, el hábito de crecimiento puede ser afectado por éste.

Según, CIAT (1986) se considera que los hábitos de crecimiento pueden ser agrupados en cuatro tipos principales: **Tipo I:** hábito de crecimiento determinado arbustivo, **Tipo II:** hábito de crecimiento indeterminado arbustivo, **Tipo III:** hábito de crecimiento indeterminado postrado, **Tipo IV:** hábito de crecimiento indeterminado trepador

2.2.3 Hoja: Las plantas de frijol presentan hojas simples y compuestas. Las simples, que se denominan también primarias, son las que se forman en la semilla durante la embriogénesis. Son opuestas, unifoliadas, auriculadas, acuminadas y sólo se presentan en el segundo nudo del tallo principal, a continuación del nudo cotiledonar. Las hojas compuestas son trifoliadas y corresponden a las hojas características del frijol, de tamaño variable según la variedad.

2.2.4 Flor: puede presentar diversos colores, únicos para cada variedad, aunque en las variedades más importantes la flor es blanca. Las flores se presentan en racimos en número de 4 a 8, cuyos pedúnculos nacen en las axilas de las hojas o en las terminales de algunos tallos.

La morfología floral del fríjol favorece el mecanismo de autopolinización, ya que las anteras están al mismo nivel del estigma y, además, ambos órganos están envueltos completamente por la quilla. Cuando se produce el derrame del polen (antesis), éste cae directamente sobre el estigma.



Figura 2: Flor de *Phaseolus vulgaris*.

2.2.5 Fruto: Legumbre de color, forma y dimensiones variables, en cuyo interior se disponen de 4 a 6 semillas. Existen frutos de color verde, amarillo jaspeado de marrón o rojo sobre verde, etc., Esta gran variabilidad de los caracteres externos de la semilla se tiene en cuenta para la clasificación de las variedades y clases comerciales de frijol.

Tabla 1: Escala de color de la semilla de frijol. Fuente: CIAT, 2011

COLOR DE SEMILLA	DESCRIPCION
1	BLANCOS
2	CREMAS , BAYOS
3	AMARILLOS , DORADOS
4	CAFÉ , MARRON
5	ROSADO
6	ROJOS
7	MORADOS
8	NEGROS
9	GRIS , VERDE y COLORES RAROS

Tabla 2: Escala de tamaño de la semilla de frijol según el peso de 100 semillas.

Fuente: Referencia personal

TAMAÑO DE SEMILLA (peso de 100 sem)	DESCRIPCIÓN
1 _ 25	PEQUEÑO
26 _ 40	MEDIANO
> 40	GRANDE

2.3 ORIGEN Y DOMESTICACIÓN DEL FRIJOL COMÚN

Hallazgos arqueológicos, datos botánicos y tradiciones orales, han demostrado que el frijol silvestre se desarrolló en una gran variedad de ambientes, desde el norte de México hasta el noroeste de Argentina (Gepts & Debouck, 1991).

Formas cultivadas de frijol estuvieron presentes hace 7000-8000 años en los valles de Tehuacan y Oaxaca, en México, en América Central, Perú, Ecuador, Argentina y Chile (Kaplan & Kaplan, 1988; Gepts & Debouck, 1991).

Gepts (1988), Gepts & Bliss (1986) y Singh *et al.* (1991) encontraron un interesante paralelismo geográfico entre el tipo de faseolina presente en la semilla y el tamaño de esta. Ellos encontraron que en América Central los cultivares poseen predominantemente faseolina tipo "S", semillas pequeñas (17-28 g/100 semillas), están más adaptadas a zonas bajas y cálidas, y cultivadas principalmente en México y América Central. Por el contrario, en los países andinos los cultivares mayoritariamente contienen faseolina tipo "T", semillas más grandes (mayor de 40 g/100 semillas), y están adaptadas a zonas de cultivo de mayor altitud.

Otros estudios sobre variabilidad de proteínas en la semilla (Gepts & Bliss, 1986), aloenzimas (Singh *et al.*, 1991), caracteres morfológicos de la planta (Singh *et al.*, 1991b), y marcadores moleculares (Nodari *et al.*, 1992, Becerra-Velázquez & Gepts, 1994, Beebe *et al.*, 2000, Blair *et al.*, 2007, Blair *et al.*, 2006) indican la presencia de dos centros de domesticación del frijol cultivado. En 1991 Singh *et al.* los describieron como producto de un proceso de domesticación simultáneo en diferentes regiones de América del Sur y Central, a partir de un ancestro que había pasado por una evolución divergente. Los acervos genéticos fueron denominados Andino y Mesoamericano, respectivamente.

Con base en sus características morfológicas y tipo de faseolina (Gepts & Bliss, 1986), las variedades silvestres y cultivadas de la región mesoamericana se dividieron en tres razas: Mesoamérica, Jalisco y Durango. Beebe *et al.*, (2000) determinó por medio de análisis RAPD un cuarto grupo conteniendo frijoles de origen mayoritariamente guatemalteco, trepadores, algunos de hábito de crecimiento tipo III, designada raza Guatemala.

Análogamente, las variedades de frijol provenientes de la zona Andina fueron clasificadas como razas Nueva Granada, Perú y Chile. Posteriormente, Beaver (1993) sugirió que el Caribe puede ser considerado un acervo genético secundario para los frijoles andinos.

2.4. IMPORTANCIA DEL FRIJOL COMUN

Phaseolus vulgaris es una de las leguminosas más importantes en el mundo, procedida solamente por la soja y el cacahuate. Su importancia radica en que es una fuente de calorías, proteínas (20 y 28%), fibra dietética, minerales como la metionina (0,17 y 0,53%), la lisina, (1,69 y 2,44%), y el triptófano (14 y 0,22%) y vitaminas, tanto en países desarrollados y subdesarrollados.

Es cultivado principalmente por vainas verdes, granos tiernos y granos secos aunque en algunos países de Latinoamérica y África se consumen las hojas y flores jóvenes y tiernas como vegetales y frescos.

Además, las hojas verdes, las hojas y el tallo sirven como alimento para el ganado, además que los rastrojos de las plantas usados como abono y combustible para cocinar. En zonas de Perú y Bolivia también se consumen las semillas tostadas que reciben el nombre de ñuñas (Singh, 1999).

2.5 PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE FRIJOL COMÚN

2.5.1 Producción mundial de frijol

La producción total del frijol en el mundo excede las 23 millones de toneladas métricas (TM), de las cuales siete se producen en América Latina y África. La dieta de subsistencia de los agricultores en África y en América Latina en general es rica en carbohidratos pero insuficiente en proteínas (Gepts *et al.*, 2005).

En el caso de México a pesar de que es uno de los principales productores de frijol a nivel mundial, en las últimas décadas ha pasado de ser un país productor a un importador, principalmente por las bajas tasas de productividad en el campo (Estrada G., *et al.* 2008), por otro lado Nicaragua al igual que otros países de Centroamérica presentan bajos niveles en el rendimiento y la productividad, lo que se ha debido a que el cultivo se muestra altamente vulnerable a daños climáticos (propios del trópico) e incidencias de plagas, y no ha alcanzado un buen desarrollo tecnológico (Paz *et al.*, 2007).

La producción nacional de estos países no logra cubrir la demanda interna del producto en cada país por lo que debe ser cubierta con importaciones interregionales (excedentes de producción) y extrarregionales, siendo los principales países de origen: Estados Unidos, Canadá y Chile (Paz *et al.* ,2007)

2.5.2 Producción de frijol en Colombia

El frijol es una de las principales actividades de la economía campesina en varias regiones del país, de mucha importancia como generador de ingresos y empleo rural y como producto básico en la dieta alimenticia de la población por su alto contenido de proteínas y de elementos minerales esenciales. A él se dedican 120.000 pequeños productores que siembran 101.559 hectáreas, con una producción de 110.579 toneladas al año, que no son suficientes para abastecer el consumo interno.

No obstante, en los últimos años el frijol en Colombia ha perdido competitividad frente a la producción de otros países, en el marco de la globalización, especialmente por los altos costos de producción, además de diversos problemas bióticos que se presentan en la zona (Arias *et al.*, 2007).

2.5.3 Problemas en la producción de frijol

La producción de frijol común se ve limitada por diversos factores (Singh, 1999) que se pueden agrupar en 3 categorías:

Biológicos: Dentro de estos hay que considerar las enfermedades, plagas y malas hierbas, que afecta el cultivo disminuyendo el rendimiento.

Edáficos: Un factor limitante es la baja fertilidad del suelo, la deficiencia de Fosforo y Nitrógeno (Singh, 1999), además de las concentraciones de aluminio y magnesio (Wortman et al., 1998), que pueden llegar a niveles muy elevados siendo toxicas para las plantas. También son importantes las deficiencias de potasio y hierro, provocando esta última una clorosis, sobre todo en suelos con pH elevado.

Climáticos: Aquí cabe destacar la sequía y las altas temperaturas (White, 1988)

2.6 FITOMEJORAMIENTO

La necesidad de aumentar la producción agrícola, para la alimentación de la población mundial, ha llevado a los mejoradores de plantas a un uso racional de los recursos genéticos; de manera que se maximice la producción sin afectar la diversidad de las plantas y se disminuya la escala de erosión genética (Plucknett et al., 1992). En el último siglo, el fitomejoramiento basado en el método de hibridación entre diferentes variedades de la misma especie, junto con métodos especiales de selección en generaciones segregantes subsecuentes, ha alcanzado extraordinarios resultados que han repercutido considerablemente en la producción agrícola mundial (Vallejo y Estrada, 2002), como tolerancia a la sequía y a los suelos ácidos, en la habilidad simbiótica para la fijación del nitrógeno en la arquitectura de la planta y en otras características. Sin embargo, los mejoradores se han encontrado con limitaciones en la velocidad y precisión con que muchas de las características útiles pueden ser identificadas, seleccionadas, y utilizadas en sus programas de mejoramiento (Kelly et al., 1994).

Teniendo en cuenta lo anterior, los genotipos silvestres representan una fuente de diversidad adicional para los genotipos mejorados, convirtiéndose en un reto para el mejorador encontrar el sistema de cruzamiento y la selección que permita transferir esta diversidad con la mayor eficiencia a los cultivados. (Gepts, 1994).

2.6.1 Mejoramiento genético de frijol

La obtención de genotipos mejorados con resistencia a estrés biótico y abiótico es un objetivo primario en programas de mejoramiento del frijol en cada región donde se cultiva.

Con este objetivo se utilizan 3 pasos principales:

1. Ampliación de la base genética de variedades comerciales, en el cual se tiene una gran variedad de germoplasma muy diverso que satisface el mejoramiento a largo plazo y del cual se busca introgresar genes a genotipos fácilmente manejables (Kelly et al,1999)
2. Se realizan cruces solamente dentro de la misma raza o el mismo pool de genes con el fin de ir buscando características deseadas y creando padres cercanos a un fenotipo comercial (Kelly et al,1999)
3. Cruce elite, es decir lo mejor por lo mejor, líneas agronómicamente similares de altos rendimientos pero genéticamente distantes y selección de parentales genéticamente diversos ayudados de marcadores moleculares (Kisha *et al.*, 1997)

2.6.2 Retrocruza

Los parientes silvestres de las plantas cultivadas pueden ser importantes fuentes de genes en el mejoramiento genético, ya que han jugado un papel de importancia tanto en la supervivencia como en la evolución de los cultivos, y en varios casos una fracción de su material genético es exclusivo y es un recurso potencial en el mejoramiento de las especies cultivadas (Casas et al., 2003).

Se ha señalado que con el uso de parientes silvestres como fuente de germoplasma para cultivares se podría incrementar el rendimiento de líneas elite, mejorar algunas características agronómicas y diversificar la fuentes de germoplasma y así mejorar su valor agronómico y genético (Cohen y Galinat, 1984; Edwards et al, 1996; Edwards y Coors, 1996). La infiltración gradual de germoplasma de una especie dentro de otra, a través de retrocruzamiento, ha sido considerado un factor importante en el enriquecimiento genético (Doebley et al., 1984).

Este método propuesto por Harland y Pope (1922), constituye una forma precisa de mejorar variedades que son sobresalientes para un buen número de características pero que son deficientes para una o pocas. Ha sido muy utilizado para incorporar resistencia a determinadas enfermedades en variedades cuya susceptibilidad puede comprometer la estabilidad de la producción.

Con esta estrategia se busca reducir la variación genética indeseable atribuida al silvestre, por medio de retrocruzamientos hacia el cultivado. Consiste en cruzar una variedad de interés que actúa como genitor recurrente (cultivar) con otra variedad que presenta un carácter de interés (silvestre), no presente en el parental recurrente. Los productos del cruzamiento que llevan el gen o los genes (F1) se retrocruzan con el parental recurrente. Este proceso se repite con los productos de los retrocruzamientos, teniendo en cuenta que la cantidad de retrocruzamientos depende del grado de disimilaridad entre los padres. Así, Cada vez que se hace el retrocruzamiento con el parental recurrente se reduce a la mitad el aporte del germoplasma del donante (Cubero, 1999). De esta manera, cualquier diferencia entre el parental cultivado y la línea avanzada puede ser atribuida a los alelos derivados del parental silvestre o donante (Kelly et al., 2000)

2.7 MARCADORES GENÉTICOS

Los marcadores genéticos representan diferencias genéticas entre individuos o especies, generalmente no representan genes blanco pero actúan como señales o marcas ya que se encuentran cerca de los genes de interés, la mayoría no afecta el fenotipo de la característica de interés ya que se encuentran cerca o ligados a los genes que controlan la característica (Collard *et al.*, 2005). Existen tres tipos principales de marcadores genéticos: morfológicos (visibles), bioquímicos (isoenzimas) y de ADN (moleculares)

2.7.1 Marcadores morfológicos

La posibilidad de usar marcadores morfológicos como una ayuda en la selección de caracteres cualitativos y cuantitativos en plantas fue sugerida por Sax (1923) hace ya más de 90 años. Son caracteres fenotípicos controlados generalmente por un locus, que se expresan en diferentes ambientes, dicho carácter puede ser enmascarado por efectos epistáticos o pleiotrópicos, además, los alelos interactúan de manera dominante o recesiva lo que dificulta diferenciar un individuo homocigoto de un heterocigoto y, por tanto, su número y utilización es limitado (Vodenicharova, 1989).

Tradicionalmente la variabilidad intra e interespecífica de *P.vulgaris*, se ha evaluado a través de características morfológicas, las que incluyen las agronómicas (Voyses et al., 1994). Sin embargo, este tipo de caracterización no siempre refleja la variación genética real, debido a que el fenotipo está determinado parcialmente por la información genética del individuo, e influenciado por el ambiente donde se desarrolla (Valadez *et al.*, 2001).

2.7.2 Marcadores bioquímicos o isoenzimas

Fueron descubiertos en la década de los 70 (Kelly et al., 1994), son marcadores que constituyen los productos directos de los alelos, por ende solo basta con identificarlos para seleccionar la planta con el fenotipo deseado, que es producido por el alelo de interés (Vallejo y Estrada, 2002). Los isoenzimas han permitido la clasificación del frijol en dos grandes grupos de variabilidad genética, correspondientes a los dos centros de domesticación del frijol: el Andino y el Mesoamericano. Sin embargo, estos marcadores tienen limitaciones debido a la poca variabilidad que ellas permiten detectar en cada grupo genético (Kelly et al., 1994).

2.7.1 Marcadores de ADN

Los marcadores de ADN se fundamentan en el análisis de las diferencias de las secuencias de ADN entre individuos. Estos marcadores pueden ser de diferente tipo según la metodología empleada (Karp y Edwards, 1998). Son utilizados para identificar o marcar alelos de difícil expresión fenotípica, en otras palabras son herramientas que facilitan la selección del alelo de interés a través del marcador. Estos deben ser altamente heredables, de fácil evaluación y estar íntimamente ligados al alelo que se desea seleccionar (Vallejo y Estrada, 2002)

De esta manera los marcadores de ADN se convierten en herramientas muy eficientes para efectuar selección indirecta de alelos de interés para los programas de mejoramiento. Además, por poseer un número ilimitado de polimorfismos con base en el ADN y ser independiente del efecto del ambiente y del estado fisiológico de la planta, permiten identificar en forma precoz y precisa las plantas con una mejor combinación de alelos favorables (Vallejo y Estrada, 2002). En la actualidad son utilizados en estudios de variabilidad genética, identificación de cultivares, mapeo genético o incremento del conocimiento de la organización del genoma (Vallejo y Estrada, 2002)

Según Karp *et al.* (1997) dentro de este grupo se incluyen tres categorías básicas. Categoría 1: métodos que no se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por ejemplo, RFLP y número variable de repeticiones en tandem (VNTRs). Categoría 2: técnicas que utilizan iniciadores (“primer”) arbitrarios o semiarbitrarios, por ejemplo, iniciadores PCR múltiples arbitrarios (MAAP), RAPD, RAMPO. Categoría 3: PCR con sitio “objetivo específico”. Por ejemplo, SSR, Intersecuencias simples repetidas (ISSR). Las categorías 2 y 3 son marcadores basados en la PCR.

2.7.1.1 Microsatélites

Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) son repeticiones cortas en serie entre 2 a 10 pares de bases, altamente variables dispersas a través de los genomas de hongos, plantas y animales, los cuales pueden o no estar asociadas con genes. Igualmente, estas secuencias no codifican para formar ninguna proteína, y debido a que las secuencias de ADN repetitivo pueden recombinarse y expandirse más frecuentemente que otros tipos de secuencias, además de su alta variabilidad, son consecuentemente útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas (Phillips *et al.* 1995; Valadez y Kahl 2000). Estos polimorfismos se dan debido por la pérdida o ganancia de repeticiones, lo que se atribuye a mutaciones durante la replicación. Así, Los tipos de repeticiones que ocurren en los SSR varían entre las especies. Las repeticiones más frecuentes en las plantas son (AA)_n y (AT)_n (Lagercrantz *et al.* 1993) que se encuentran en segmentos grandes del genoma que no codifican para genes conocidos (Phillips *et al.*, 1995). Wu y Tanksley (1993) reportaron que las secuencias GAn y GT_n y sus complementos se presentan distribuidos por todo el genoma del maíz y arroz. Swati *et al.*, (1997) reportaron que los di y tetranucleotidos se presentan en su mayoría en regiones no codificantes del genoma, mientras que alrededor del 57% de las repeticiones de trinucleotidos se encuentran cerca de genes.

Los SSR pueden ser Genómicos o Génicos: Se dice que son genómicos cuando han sido identificados a partir de bibliotecas genómicas y forman parte de regiones no codificantes, y pueden tener una naturaleza génica cuando forman parte de regiones que codifican para proteínas, por lo que generalmente son desarrollados a partir de secuencias expresadas o secuencias genéticas (Blair et al, 2003)

En conclusión, los microsatélites constituyen una técnica basada en PCR altamente reproducible, robusta e informativa, de fácil implementación en laboratorios de medianos recursos siempre y cuando se utilicen en cultivos ampliamente estudiados, como es el caso del frijol (Ferreira y Grattapaglia,1998) explicando la diversidad existente y discriminando entre individuos (Blair *et al.* 2007a).

2.8 MAPAS DE LIGAMIENTO

Uno de los principales usos de los marcadores de ADN ha sido la construcción de mapas de ligamiento, en donde, se indica la posición y distancia relativa entre los marcadores dentro de un cromosoma (Patterson 1996; Collard et al., 2005).

Los mapas de ligamiento son basados en el principio de que los genes (marcadores o loci) segregan vía recombinación de los cromosomas durante la meiosis, permitiendo así su análisis en la progenie (Patterson, 1996), de esta manera los mapas de ligamiento permiten realizar un análisis completo de los genotipos, descomponer características complejas en sus componentes mendelianos, localizar regiones genómicas que controlan caracteres de importancia agronómica, además de cuantificar el efecto de estas regiones (Ferreira y Grattapaglia,1998).

El uso más importante de los mapas de ligamiento es la identificación de sitios que contienen genes y QTLs asociados con rasgos de interés, estos mapas se denominan mapas de QTLs, basados en el principio de la detección de la asociación entre marcadores fenotípicos y genotípicos. Los marcadores son usados para dividir la población en grupos genotípicos basados en la presencia-ausencia de un marcador particular, y así determinar si existe diferencia significativa entre grupos con respecto al marcador y al rasgo evaluado (Tanksley, 1993, Young, 1996), una diferencia significativa entre la media fenotípica de los grupos, indica que el marcador está asociado a un QTL (Collard et al., 2005).

2.8.1 Requerimientos para el mapeo genético

Los padres que se utilicen para desarrollar un mapa de ligamiento deben divergir en una o más características de interés ya que si no son contrastantes la progenie puede llegar a resultar estéril y se pueden presentar grandes niveles de distorsión en la segregación durante el análisis de ligamiento. Las poblaciones de mapeo pueden ser de varios tipos: La progenie de la segunda generación (F_2), retrocruzas (BC), líneas recombinantes hermanas (RILs), dobles haploides (DH) y líneas isogénicas cercanas (NILs) (Burr et al., 1998; He et al., 2001; Doerge, 2002).

Cada población de mapeo tiene sus ventajas y desventajas, por esta razón se escoge dependiendo del objetivo, el tiempo que se tiene para desarrollar la población y de los marcadores moleculares que se vayan a usar (dominantes o codominantes). Además, según Ferreira et al., (2006) las poblaciones de mapeo deben estar entre 50 a 1000 individuos, aunque se recomienda para una mejor resolución del mapa usar poblaciones con más de 200 individuos (Mohan et al., 1997).

Llevando a cabo los requerimientos mencionados anteriormente, se procede a la identificación marcadores moleculares polimórficos entre los padres evaluados (Sayed et al., 2002; Xu et al., 1997), posteriormente se codifican los datos de cada marcador sobre cada individuo de la población y el análisis de ligamiento entre los marcadores mapeados (Collard et al. ,2005)

2.8.2 Selección de marcadores moleculares

Los marcadores mas recomendados para la construcción de mapas de ligamiento son los microsatélites ya que poseen un elevado contenido de información (expresión codominante, multiallelismo e hipervariabilidad) en comparación con otros marcadores, lo que los hace muy confiables para trabajar con cualquier población segregante para estudios de ligamiento y mapeo genético, comportándose como anclas o puntos de referencia en regiones específicas del genoma a evaluar (Semagn, 2006).

2.8.3 Análisis de ligamiento de los marcadores

El ligamiento entre marcadores es usualmente calculado usando la desigualdad de proporciones (odds ratios) la probabilidad de ligamiento versus la probabilidad de no ligamiento. Esta probabilidad es expresada como el logaritmo de la probabilidad y es llamada LOD (Rish, 1992).

Un valor LOD mayor a 3 es el comúnmente usado para la construcción de los mapas. Un valor LOD de 3 entre 2 marcadores indica que el ligamiento es 1000 veces más probable (1000:1).

Los Software más comúnmente usados incluyen MapMaker/EXP (Lander et al., 1987; Llincoln et al., 1993), y MapManager (Manly et al., 2001).

2.8.4 Grupos de ligamiento

Los marcadores ligados son agrupados en grupos de ligamiento los cuales representan secciones del cromosoma o cromosomas enteros. De esta manera la frecuencia de recombinación y la distancia de los marcadores no son igual en todos o cromosomas (Hartl y Johns, 2001; Young, 1994). La medida de la distancia genética y la determinación del orden de los marcadores está relacionada con el número de individuos estudiados en la población de mapeo (Young, 1994).

2.8.5 Distancias genéticas y Funciones de Mapeo

La distancia genética en mapeo de ligamiento se mide en Centimorgan (cM) unidad de ligamiento que hace referencia a la distancia entre dos loci determinada por la frecuencia con que se produce la recombinación entre ellos. Se dice que dos loci están a un centimorgan de distancia si se observa recombinación entre ellos en el 1% de las meiosis (Semagn et al., 2006)

Dos funciones de mapeo son comúnmente usados:

- **Kosambi:** La cual asume que los eventos de recombinación influyen la ocurrencia de eventos de recombinación adyacentes.
- **Haldane:** Asume que no hay interferencia entre eventos de cruzamiento.

2.8.6 Mapas de ligamiento en frijol

En frijol se han reportado varios mapas de ligamiento entre los que podemos encontrar:

BAT93 X JALO EEP558 (F2): El mapa tuvo 194 RFLP (Nodari et al.,1992), posteriormente se incorporaron RAPD junto con otros RFLP, así se estableció un mapa consenso con 470 RFLP, 570 RAPDs, 40 marcadores bioquímicos y morfológicos llegando a una longitud de mapa de 1200cM (Adam-Blondon et al.,1994;Nodari et al.,1992;Vallejo et al.,1992).

La integración de microsatélites en el mapa molecular de frijol, fue realizada por primera vez por Yu et al., (2000), con una asignación de 15 marcadores microsatélites al mapa de ligamiento. Desarrollaron y probaron 37 primers en la población utilizada para hacer el mapa, 16 de los primers polimórficos de las líneas parentales se analizaron por segregación y 15 se asignaron a 7 grupos de ligamiento diferentes, lo que indico buena distribución a lo largo del genoma de frijol (Yu et al., 2000).

Gaitan y Solis et al., (2002), aislaron microsatélites para establecer su capacidad de diferenciación y así utilizarlos en estudios de diversidad y mapeo genético. Aislaron, clonaron y secuenciaron fragmentos de ADN genómico que contenían loci de microsatélites de 3 librerías genómicas de *Phaseolus vulagris*. Casi todos los loci de microsatélites mostraron un gran poder de diferenciación y altos niveles de polimorfismo.

En 2003, se desarrollo un mapa con marcadores microsatélites ligados al genoma de frijol común (Blair et al., 2003). La posición de 100 loci genéticos, fue determinada con un total de 150 microsatélites desarrollados para esta especie y probados por polimorfismos parentales. Estos marcadores microsatélites se utilizaron para ligar dos mapas basados en RFLP, incluyendo el realizado por Freyre et al., (1998) y Vallejos et al., (1992), con una mapa desarrollado en una población Mesoamericana x Andina (DOR 364 X G19833). Se mapearon dos tipos de microsatélites génicos y genómicos, de los cuales los primeros resultaron ser menos polimórficos (Blair et al., 2003).

Por otro lado en cuanto a poblaciones generadas específicamente para evaluar características agronómicas relacionadas con el rendimiento podemos encontrar la reportada por Iriarte (2002), que es una cruce entre un silvestre 624404 y un cultivar Radical Cerinza con 157 individuos en donde se mapearon 62 marcadores microsatélites, 4 morfológicos y 1 SCAR con una distancia total cercana a los 2500cM con un marcador en promedio cada 5.6cM. También Buendía (2001) reporto un mapa de ligamiento de la población DOR390 X G19892 con 27 marcadores RAPD, 21 marcadores microsatélites y 1 tipo SCAR, en el que se logro una distancia de 692 cM.

2.9 LOCI DE CARACTERISTICAS CUANTITATIVAS (QTL)

El mapeo de características cuantitativas a través de la identificación de loci de caracteres cuantitativos (QTL, *Quantitative Trait Loci*) (Cerón-Rojas y Sahagún-Castellanos, 2007; Martínez-Gomez *et al.*, 2005). Conceptualmente puede ser influenciado por un grupo amplio de genes que presentan una baja expresión sobre el rasgo o pocos genes que generan un gran efecto sobre este (Gelderman, 1975).

Estudios de mapeo de QTLs se han reportado en diversos cultivos para diversos rasgos como componentes de rendimiento, enfermedades y resistencia a insectos entre otros, considerándose una herramienta importante dentro del mejoramiento genético de plantas (Cerón-Rojas y Sahagún-Castellanos, 2007).

Por medio de software (WinQTL) se busca una asociación entre una característica fenotípica y un marcador genotípico. De esta manera los marcadores son utilizados para dividir la población de mapeo en diferentes grupos genotípicos basados en la presencia-ausencia de un locus marcador particular y determinar diferencias significativas existentes entre grupos con respecto al marcador y al rasgo evaluado (Tanskley, 1993; Young, 1996).

Una diferencia significativa entre la medida fenotípica evaluada de los grupos indica que el locus marcador está ligado al QTL controlando el rasgo (Collard et al., 2005).

Según Lander y Kruglyak (1995), los QTLs se pueden clasificar en sugeridos, significativos, y altamente significativos, esta clasificación sirve para evitar falsos positivos y medir el grado de confianza del QTL encontrado. Por otro lado, pueden ser definidos como QTL mayor o menor, clasificación que está dada por el porcentaje del fenotipo explicado por el QTL, cuando explica más del 10% de la variación fenotípica se clasifica como un QTL mayor y cuando explica menos del 10% es considerado un QTL menor (Lindhout, 2002; Pilet-Nayel et al., 2002).

Hay que tener en cuenta que para la realización de un mapa QTL se necesita una población segregante como F2 o retrocruzas (Ferreira y Grattapaglia, 1998) además de métodos biométricos que muestren si el marcador está relacionado con el rasgo fenotípico y detectar los parámetros de los QTL detectados.

2.9.1 Análisis de QTLs

Los métodos para detección de QTLs mas ampliamente usados son:

- **Análisis de un solo marcador**

Es el método más simple para detectar QTL asociados con un solo marcador, entre los parámetros estadísticos usados para el análisis de un solo marcador se incluye la prueba- t , el análisis de varianza (ANOVA), y la regresión lineal. La regresión lineal, es la más usada porque el coeficiente de determinación (R^2) del marcador, explica la variación fenotípica que surge del QTL unido al marcador.

Este método no requiere un mapa de ligamiento completo y puede desarrollarse con “software” estadístico básico. Sin embargo, tiene una desventaja y es que entre más lejano esté el QTL del marcador, la probabilidad para identificarlo será menor y por lo tanto se subestime la magnitud del efecto del QTL (Tanksley, 1993).

- **Análisis de mapeo por intervalo simple**

Este método hace uso de mapas de ligamiento y analiza intervalos entre pares de marcadores adyacentes y ligados a lo largo de los cromosomas, en lugar de analizar un sólo marcador (Lander y Botstein, 1989). El uso de marcadores ligados para el análisis compensa la recombinación entre los marcadores y el QTL, por lo tanto se considera estadísticamente más confiable, comparada con el análisis de un solo marcador (Lander y Botstein, 1989; Liu, 1998).

- **Análisis de mapeo por intervalo compuesto**

Este método combina regresión lineal y mapeo por intervalo, e incluye marcadores genéticos adicionales. (Jansen, 1993; Jansen y Stam, 1994; Zeng, 1994., 1993). La principal ventaja del uso de éste método es su efectividad y QTL ligados (Collard *et al.*, 2005).

2.9.2 QTLs asociados a características de rendimiento frijol

En frijol se han identificado varios QTLs para resistencia a enfermedades como *Thrips palmi Karni* (Frei et al., 2005) y a *Apion godmani Wanger* (Blair et al., 2006), para algunos caracteres agronómicos como rasgos de productividad (Blair et al., 2006), periodo de tiempo para floración y maduración, vainas totales por planta y semillas por vaina entre otros (Tar`an et al., 2002) y para rasgos fisiológicos como la producción de exudados y pelos radicales (Yan et al., 2004).

Iriarte, G (2002) encontró un QTL para rendimiento causado por el padre silvestre lo que explica la introgresión del silvestre en la población, además de otros 2 QTLs atribuidos al padre recurrente, igualmente se ubicaron 19 QTLs mas de los cuales 4 fueron para días a floración, 5 para numero de vainas por planta. Igualmente, Izquierdo, P (2010) identifico un QTL relacionado con el rendimiento que explico el 8% de la variabilidad en la población G10022 x RADICAL CERINZA para este rasgo, además de 9 QTLs para peso de 100 semillas y 3 para vainas por planta.

2.10 LIBRERIAS DE LINEAS DE SUSTITUCION DE SEGMENTOS CROMOSOMICOS (CSSLs)

Los CSSLs son herramientas muy importantes para la identificación de alelos favorables en germoplasmas silvestres, evaluando la introgresión de estos genes en especies cultivadas (Liakat. M, 2010). Representando así, una gran herramienta para aprovechar el potencial genético de germoplasma silvestre y seleccionar las líneas con una superior introgresion que contengan particulares rasgos de interés.

3. JUSTIFICACIÓN

El máximo rendimiento experimental de algunos cultivares de frijol arbustivo se estima en más de 5000 Kg./Ha bajo condiciones óptimas de producción en monocultivo, pero los rendimientos más altos obtenidos por los agricultores rara vez alcanzan los 2500 Kg./Ha bajo condiciones similares llegando solamente a un rendimiento promedio mundial de 600 Kg./Ha, esto se debe entre otras causas a que generalmente el frijol se cultiva en áreas marginales, en época donde compete con otros cultivos y las variedades actuales son frágiles a los efectos del ambiente (Schoonhoven *et al.*, 1985).

México siendo el segundo productor de frijol en el mundo después de Brasil, consume aproximadamente 1.2 millones de toneladas de frijol al año y a pesar de cultivar cerca de 1800000 hectáreas de frijol, la demanda interna no es satisfecha por la productividad del cultivo, ya que la producción de frijol en el ámbito nacional es muy vulnerable a las condiciones climatológicas que prevalecen durante el ciclo productivo (FIRA,2001).Igualmente, Colombia, a pesar de ser un gran productor y consumidor de frijol no puede satisfacer las necesidades del mercado lo que ha llevado a la importación del producto (Voyses,2000).

Por esta razón, es importante implementar nuevas tecnologías de fitomejoramiento como las técnicas moleculares que permitan la obtención de semillas con características genéticamente deseables que lleven a una mejor producción y rendimiento en campo. El uso de mapas genéticos de marcadores moleculares para el estudio de la herencia de características cuantitativas, permite la identificación de cromosomas (o grupos de ligación) los cuales son importantes para determinar la expresión de un carácter y de esta manera llegar a manipular el factor individualmente durante el proceso de mejoramiento.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GENERALES

Identificar por medio de marcadores moleculares, regiones asociadas a características agronómicas relacionadas con componentes de rendimiento, que provengan de alelos del padre donante o silvestre, en una población de retrocruza avanzada, generada a partir de la cruce entre el genotipo de tipo silvestre G24390 y un cultivar Radical cerinza.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar el mapa genético de la población G24390 X RADICAL CERINZA.
- Establecer la ubicación relativa de los QTLs por medio de la asociación de los datos fenotípicos con los marcadores previamente localizados en el mapa genético de la población.
- Mapear los genes candidatos para rendimiento.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 EVALUACIÓN DE PARENTALES

La evaluación de los marcadores microsatélites se realizó en un grupo de 9 genotipos provenientes de diferentes acervos y países (ver tabla 3).

Tabla 3: Parentales evaluados con microsatélites

GENOTIPO	ORIGEN	ACERVO	ESTADO
G 24404	Colombia	Mesoamericano	Silvestre
CAL 143	CIAT	Andino	Cultivar
DOR 390	Colombia		Cultivar
SEA 15	CIAT	Mesoamericano	Cultivar
G 10022	México	Mesoamericano	Silvestre
SEA 5	CIAT	Mesoamericano	Cultivar
G 19892	Argentina	Andino	Silvestre
G 24390	México	Mesoamericano	Silvestre
SER 16	CIAT	Mesoamericano	Cultivar
BRB 191	Colombia		
DOR 364	Colombia	Mesoamericano	Cultivar
G 19833	Perú		Silvestre
CAL 96	CIAT	Andino	Cultivar
CIM 9314-36	Kenia		
SER 48	CIAT	Mesoamericano	Cultivar
CIM 9331-1	Kenia		
RADICAL CERINZA	Colombia	Andino	Cultivar

5.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio consta de 276 líneas provenientes de la segunda retrocruza (RC2) entre el genotipo cultivar RADICAL CERINZA y el genotipo Silvestre G24390, comportándose el primero como padre recurrente y el segundo como padre donador. Posteriormente, se realizaron selecciones individuales desde la F2 y se llevo a una F5.

Radical cerinza: Es una variedad comercial que se obtuvo a partir de la cruce realizada en el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) entre el genotipo Antioquia 10 algarrobo por L3043 y Antioquia 8 Uribe redondo por Antioquia 26 Sánchez. Esta variedad fue evaluada a partir de 1982 mediante pruebas regionales efectuadas en Cundinamarca, Boyacá y Nariño. Presenta un buen rendimiento y se adapta muy bien a zonas de clima frío localizadas entre los 2000 y 2700 m.s.n.m. Es tolerante a enfermedades tales como antracnosis, roya, oídium, mancha por Ascochyta y pudrición de raíces. (ICA, Plegable divulgativo nº 233). Esta variedad es de porte arbustivo, crecimiento erecto, ramas laterales cortas de altura entre 45 cm; hojas grandes de verde intenso brillante; flores blancas.; grano de color rojo oscuro, forma alargada ovoidal, tamaño de 15 mm de largo por 7 a 9 mm. de ancho, el peso de 100 semillas es de 53 gr. aproximadamente.



Figura 3: Semillas de Radical Cerinza Fuente: Pagina de Recursos Genéticos de CIAT.

G24390: Material silvestre. Hace parte del banco de recursos genéticos del CIAT. Es originario de México, la semilla es de color crema/negro, con habito de crecimiento es trepador y peso de 100 semillas aproximadamente de 5 g. Fue recolectado en el municipio de Srta. María del Oro, México a 640 m.s.m.



Figura 4: Semillas de G24390. Fuente: Paginas recursos genéticos de CIAT.

5.2.1 Desarrollo de la retrocruza avanzada

Las semillas F1 de la cruce simple fueron sembradas en el invernadero para ser cruzadas con el padre recurrente ICA cerinza. Los individuos procedentes de esta retrocruza se sembraron para volver a cruzar con el padre recurrente y obtener la segunda retrocruza (RC2F1). Esta generación se sembró en campo para su multiplicación obteniendo la población RC2F2. En este punto se realizó una selección individual, la cual se llevó por medio de descendencia de semilla única hasta la generación RC2F2:5.

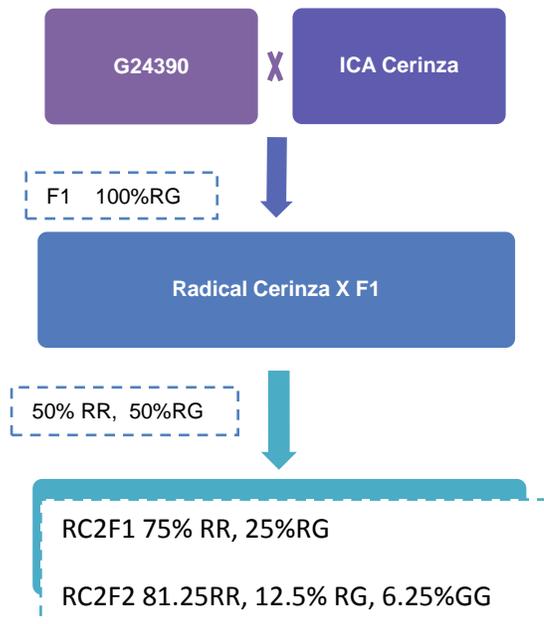


Figura 5: Esquema del desarrollo de la retrocruza avanzada G24390 X Radical cerinza

De los 276 individuos se seleccionaron al azar 96 individuos con el fin de realizar un análisis fenotípico previo. Estas líneas fueron evaluadas en dos localidades con condiciones agroecológicas diferentes con el objetivo de observar la interacción genotipo-ambiente:

- 1) Popayán en condiciones ambientales normales
- 2) Palmira en condiciones de Riego y Sequía.

Tabla 4: Condiciones geográficas y climáticas de las localidades evaluadas

CARACTERISTICAS	POPAYAN	PAMIRA
Coordenadas geográficas		
Latitud	2°41' N	03°31'48 N
Longitud	76°66 O	76°18'13 O
Altitud	1730 m.s.n.m.	996 m.s.n.m.
Condiciones climáticas		
Temperatura promedio	18.15°	25°
Precipitación	2470mm	950mm

5.2.2 Datos fenotípicos

Los ensayos se realizaron en 96 individuos escogidos al azar de la población de 276 individuos, evaluados en Palmira en el semestre B de 1998 y en Popayán en el año 1999 por trabajadores de campo del programa de frijol del CIAT. En Palmira se realizaron dos tratamientos uno con Riego y el otro de Sequía y en Popayán se realizó un tratamiento bajo condiciones ambientales normales. Se evaluaron un total de 5 características en las dos localidades:

1. Días a floración (DF)
2. Días a madurez (DM).
3. Rendimiento (REND)
4. Peso por planta (PXPLAN)
5. Peso de 100 semillas (P100S).

5.3 EXTRACCIÓN DE ADN

Comenzando el estudio se utilizo trifolios de cada una de las líneas que estaban conservados a -80° desde el año 1999, pero debido a la longevidad de este material, el ADN se degrado rápidamente, lo que llevo a utilizar la semilla y realizar la germinación de esta y así obtener un ADN de optimas condiciones. Se escogieron 10 semillas de cada una de las líneas que estuvieran en óptimas condiciones fitosanitarias y se pusieron en papel de germinación en la oscuridad por un periodo de 4 días a temperatura ambiente. Esta semilla se escarifico previamente para asegurar una rápida y uniforme germinación (Anexo A).

La extracción del ADN tanto del material conservado como el de la semilla se realizo mediante el protocolo de MINIPREP (Afanador y Hadley, 1993). (Anexo B).

Posteriormente, se hizo el gel de calidad en agarosa a 0.8% para cuantificar la concentración del ADN de los individuos, teniendo como patrón ADN λ de concentración conocida (50,100,200), esta cuantificación se llevo a cabo en el software Quantity one v 4,3,0, en el cual por medio de la comparación de la intensidad de los patrones con la intensidad de la banda de las muestras, se observa el valor aproximado de la concentración del ADN de estas y así posteriormente poder realizar la diluciones del ADN a una concentración final de 5ng/ μ l.

5.4 EVALUACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES

Se evaluó en la prueba de padres un total de 285 marcadores microsatélites provenientes de varias publicaciones de los cuales se seleccionaron solo los marcadores polimórficos para los padres Radical Cerinza y G24390, para así evaluarlos en la población derivada de esta cruce. Los microsatélites se visualizaron en geles de poliacrilamida al 4% con tinción de plata. La amplificación por medio de PCR se realizo en termocicladores Thermo (Thermo electron corporation) y PTC100 (MJ Research), con placas de polipropileno de 96 y 384 pozos, las reacciones de PCR se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Condiciones de la reacción de PCR

Reactivo	Concentración
ADN	5 μ l
Primer	0.3
Mg ⁺⁺	1.5
Buffer	1.5
dNTPs	0.2
Taq	0.3
H ₂ O	6.2

El programa de PCR que se utilizó para amplificar los microsatélites fue el reportado por Blair et al., 2003, que se muestra en la tabla 6:

Tabla 6: Programa de PCR para amplificar microsatélites

CONDICION	TEMPERATURA	TIEMPO
Denaturación	94	5 min.
	30 Ciclos	
Denaturación	92°C	30 seg.
Anillamiento	-	30 seg.
Extensión	-	45seg.
Extensión final	72°	5min

(-) Cambio de temperatura de anillamiento y extensión dependiendo del microsatélite

Posterior al producto de amplificado se adicionó 5 µl de buffer y se denaturó por un periodo de 5 minutos a 96°C para sembrar en el gel de acrilamida, sembrando en cada uno de los canales 3µl de cada muestra (producto de PCR) con la ayuda de una Hamilton, incluyendo cada 24 pozos buffer carga. Las cámaras utilizadas para la electroforesis fueron OWL T'Rex, en las cuales se dejaron correr las muestras en promedio 45 minutos a una temperatura constante de 45°C El proceso de tinción se hizo por el método de Nitrato de plata de Promega Inc (Anexo C).

5.5 MAPA DE LIGAMIENTO

Los programas para generar mapas genéticos trabajan con poblaciones de segregación 1:1, 1:2:1 o 3:1. Por ende, debido a que la población con la que se trabajo no posee ninguna de las segregaciones anteriores se hace más complejo el mapeo, teniendo que recurrir a los mapas de referencia (DOR 364 X G19833 y BAT 93 X JALOEEP558) para así confirmar la posición de los marcadores en el mapa.

Se realizo un mapa genético con los 276 individuos con ayuda de Mapmaker Macintosh v.2, por medio de la opción B2F1 ya que es la que más se aproxima a la segregación de la población de trabajo, se utilizó un LOD mínimo de 3 y la función de mapeo Kosambi. Los marcadores que fueron consistentes con los mapas de referencia fueron anclados y por medio de los comandos Group, Parwise y Try se fueron añadiendo marcadores a cada uno de los grupos de ligamiento. Ya con la salida de Mapmaker se dibujo el mapa de ligamiento en Mapdisto v 1.7.2. Beta 9 y posteriormente, se realizo un mapa con los 96 individuos escogidos al azar que poseían evaluaciones fenotípicas y en base a este identificar los QTLs (siguiendo las condiciones mencionadas anteriormente para la población completa).

5.6 ANALISIS DE QTL

Los marcadores moleculares asociados significativamente con las características evaluadas se identificaron por medio de una regresión simple o análisis de un solo marcador, realizada en el programa Qgene V. 4.0, asumiendo el modelo BC2F1 ofrecido por este para una segunda retrocruza de generación F₁.

El nivel de significancia global tomado para el análisis fue del 5%, que corresponde a un X^2 DE 14.40 (LOD=3.12). Es decir, para declarar que existe una asociación significativa del 5% entre el marcador y la característica el marcador debe presentar un LOD igual o superior a 3.12.

El método de Mapeo por Intervalo (MI) y Mapeo por Intervalo Compuesto (CIM) del programa QTL cartographer fue utilizado para determinar la localización y el efecto de los QTLs. Se utilizó el 6 correspondiente a CIM, con un tamaño de ventana de 10 cM. Para todo el análisis.

El número de marcadores de control fue 10, es decir, los 10 marcadores más significativos por fuera del intervalo tomado fueron ajustados al modelo que fueron detectados por medio de regresiones lineales múltiples para cada punto del cromosoma, estos puntos se tomaron cada 1 cM.

La probabilidad de la presencia de un QTL fue expresada como LOD y el umbral o valor por encima del cual se considera un supuesto QTL como significativo fue fijado en 2.46, según la corrección de Bonferroni (Lynch y Walsh, 1998). Todas las características se sometieron a 1000 permutaciones a un nivel de significancia del 5% para hallar un umbral empírico (Churchill y Doerg, 1994).

5.7 ANALISIS DE INTROGRESION

El análisis se realizó mediante el programa CCSSL Finder v 0.5.3 donde se identificaron el número de segmentos homocigotos introgresados del padre silvestre y el grupo de ligamiento en el cual se encontraban. También se ubicaron los segmentos de las líneas de sustitución con el fin de ubicar los posibles segmentos cromosomales de interés del genotipo silvestre. Además, se ubicaron posibles asociaciones entre los loci y las características fenotípicas, siendo significantes los que se encontraban por encima de $f < 10$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN

Se realizó una serie de pruebas estadísticas complementadas con histogramas simples de los datos de los dos tratamientos en condiciones de sequía y riego en Palmira y en Popayán en condiciones ambientales normales.

Tabla 7: Comportamiento de las 96 líneas RC2F2:5 de la cruz Radical cerinza por G24390 evaluadas en Popayán.

	DF	DM	PXP	REND	TAM
RADICAL CERINZA	38.3	80.4	4.1	903.98	62
PROMEDIO R2F2	39.6	80.6	4.4	847.7	53.5
MAXIMO DE LA POBLACION	43	85	9.4	1373.9	70
INCREMENTO/RADICAL CERINZA	4.7	4.6	5.3	469.9	8
%INCREMENTO/RADICAL CERINZA	12.2	5.7	127.6	52	12.9
MINIMO DE LA POBLACION	37	77.1	2.5	436.5	36
REDUCCION/RADICAL CERINZA	1.3	3.3	1.6	467.5	26
%REDUCCION RADICAL CERINZA	3.5	4.1	39.6	51.7	41.9

Tabla 8: Comportamiento de las 96 líneas RC2F2:5 de la cruzada Radical cerinza por G24390 evaluadas en Palmira bajo condiciones de Riego

	DF	DM	REND	PXPLAN	TAM
RADICAL CERINZA	32	68	281	2.6	62
PROMEDIO RC2F2	32	67	339	3	53
MAXIMO DE LA POBLACION	37	73	612	5	70
INCREMENTO/CERINZA	5	5	331	2	8
%INCREMENTO/CERINZA	15	7	113	89	13
MINIMO DE LA POBLACION	29	63	87	1	36
REDUCCION/CERINZA	3	6	194	2	26
%REDUCCION DE CERINZA	8	8	69	65	42

Tabla 9: Comportamiento de las 96 líneas RC2F2:5 de la cruzada Radical Cerinza por G24390 evaluadas en Palmira bajo condiciones de Sequía

	DF	DM	REND	PXPLAN	TAM
RADICAL CERINZA	30	64	435	2.8	62
PROMEDIO RC2F2	31	67	378	3	53
MAXIMO DE LA POBLACION	35	72	592	4	70
INCREMENTO/CERINZA	5	8	157	1	8
%INCREMENTO/CERINZA	18	12	36	41	13
MINIMO DE LA POBLACION	29	62	141	0.4	42
REDUCCION/CERINZA	1	2	294	2	20
%REDUCCION DE CERINZA	2	3	68	86	32

6.1.1 Rendimiento

Como se puede observar en el ensayo realizado en Popayán en el segundo semestre de 1998, el rendimiento del cultivar supero al de la población, sin embargo el 34% de las líneas de la población superaron el rendimiento del padre recurrente Radical cerinza.

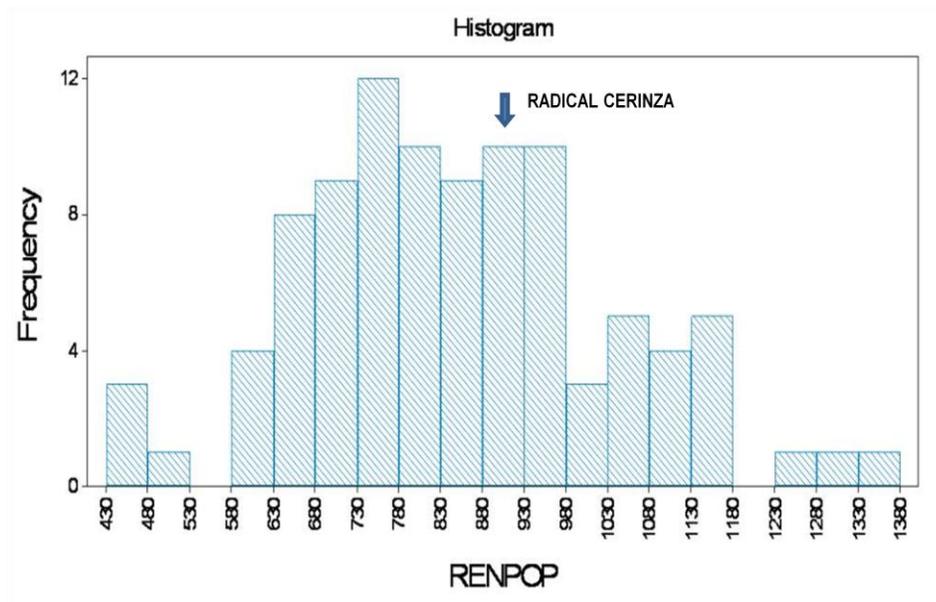


Figura 6: Histograma de Rendimiento en la localidad de Popayan

TABLA 10: Análisis de varianza para rendimiento

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Media
0.755653	3.855.306	2.317.638	6.011.555

Fuente	Rend	F-Valor	Pr > F
Loc	1	21.26	0.01
Genot	99	2.33	<.0001
Block	1	0.07	0.7863

Por otro lado en Palmira, bajo condiciones de riego, el control Radical cerinza tuvo un rendimiento de 281Kg/Ha, teniendo en cuenta, que el 68% del promedio de la población presento un rendimiento por encima de este. En contraste, en condiciones de sequía Radical cerinza presento un rendimiento mayor con 435Kg/Ha, sin embargo este incremento no fue significativo como se puede observa en la tabla 10.

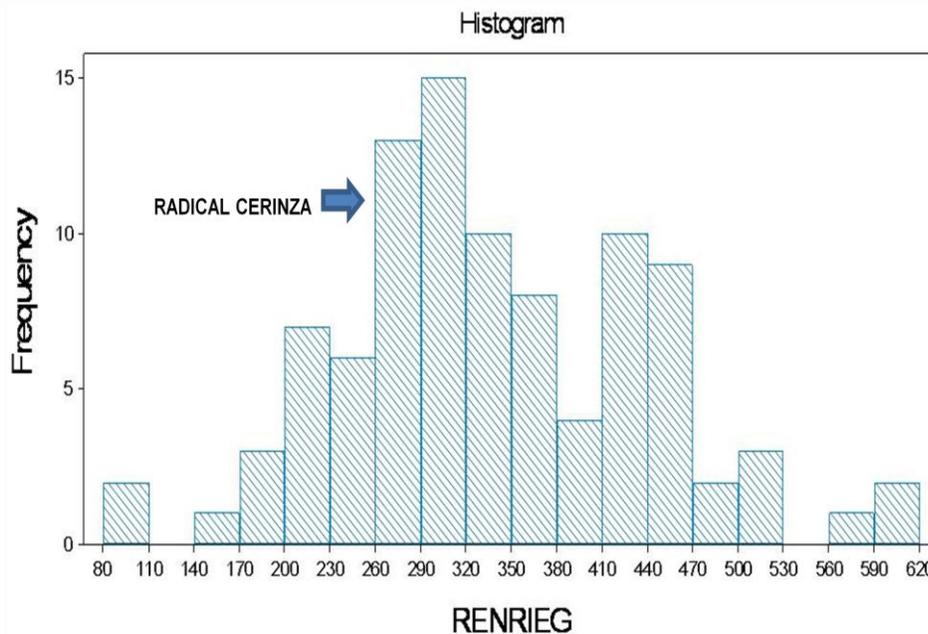


Figura 7: Histograma de Rendimiento en la localidad de Palmira bajo condiciones de Riego

Al comparar los datos de Radical cerinza y el valor promedio de rendimiento obtenidos en Palmira se puede observar que este fue mayor en sequía que en condiciones de Riego. Este fenómeno, según estudios reportados anteriormente, se pudo haber presentado debido a la presencia del hongo *Sclerotium rolfsii* en el ensayo, que es favorecido por condiciones de temperatura y humedad relativas altas, seguido de periodos secos, llevando a la pudrición de la raíz, marchitez de la planta y por ende un bajo rendimiento (Perez, J.2009).

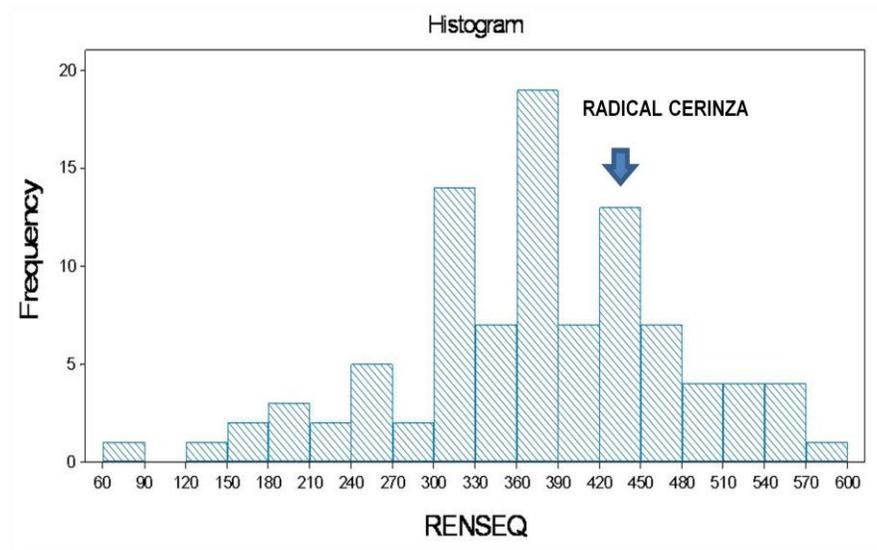


Figura 8: Histograma de Rendimiento en la localidad de Palmira bajo condiciones de Riego

Caso que es similar con las condiciones ambientales presentadas en este estudio realizado en época con temperaturas altas promedio de 29.33°C y riegos constantes, que aportaron las condiciones favorables para la evolución del Hongo. Hay que tener en cuenta, que los rendimientos en condiciones de sequía fueron bajos, considerando que rendimientos agrónomicamente buenos bajo condiciones de sequía están por encima de 800 Kg. /Ha.

Por otro lado se observo diferencia significativa entre las localidades observando en Popayán que el Rendimiento del control Radical cerinza fue mucho más alto que en Palmira, lo que es atribuido al hecho, de que este material se adapta fácilmente en las zonas de clima frío y frío moderado, localizadas entre los 2000 y 2700 m.s.n.m, condiciones que se presentan en Popayán con una temperatura promedio de 18.15°C y altura de 2470 m.s.n.m, que favorecen el desarrollo de la población.

6.1.2 DIAS A MADUREZ

En Popayán el 45% de las líneas presentaron mayor número de días a madurez que el cultivar Radical cerinza con 80 días, pero a pesar de esto el promedio de días en que se tardaron las líneas de la población en madurar no se diferencio del cultivar.

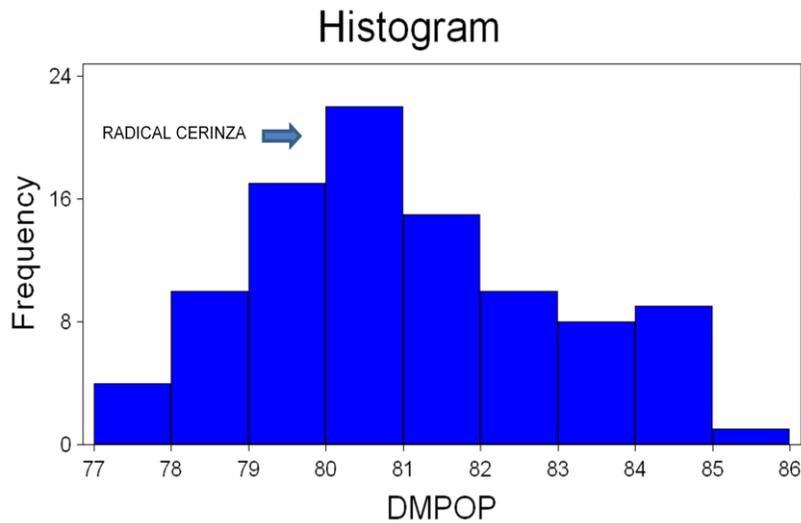


Figura 9: Histograma de días a madurez en la localidad de Popayán

Por otro lado, en Palmira en condiciones de Riego el 14% de la población maduro más rápidamente que Radical cerinza con una duración de 68 días, y el promedio de la población solo supero en un día a Radical cerinza. En contrasté con las condiciones de sequía en donde el 85% de la población supero a Radical cerinza con un duración de 64 días en madurar y el promedio de la población lo supero en 3 días. Teniendo en cuenta lo anterior aunque existe una diferencia entre sequía y riego este incremento no es significativo.

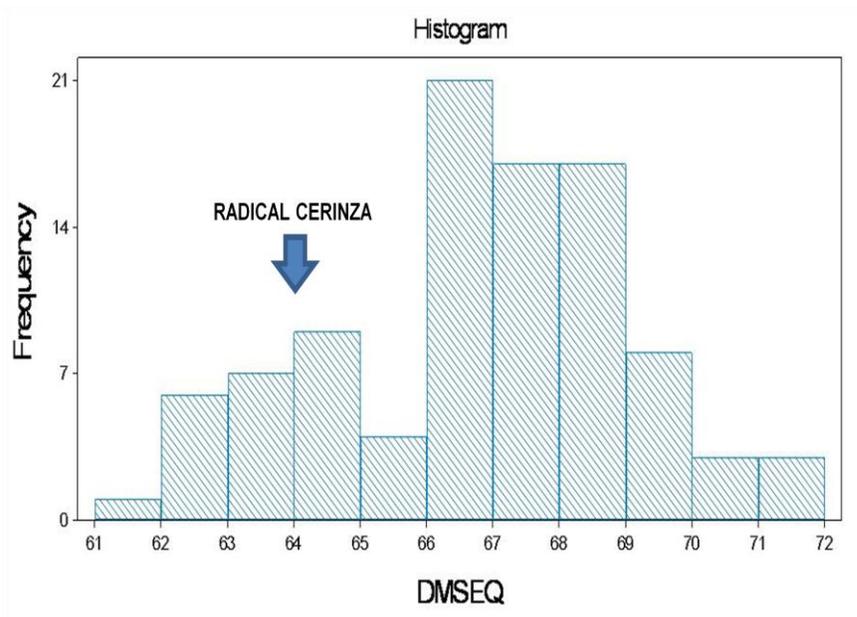


Figura 10: Histograma de días a madurez en condiciones de sequía en la localidad de Palmira

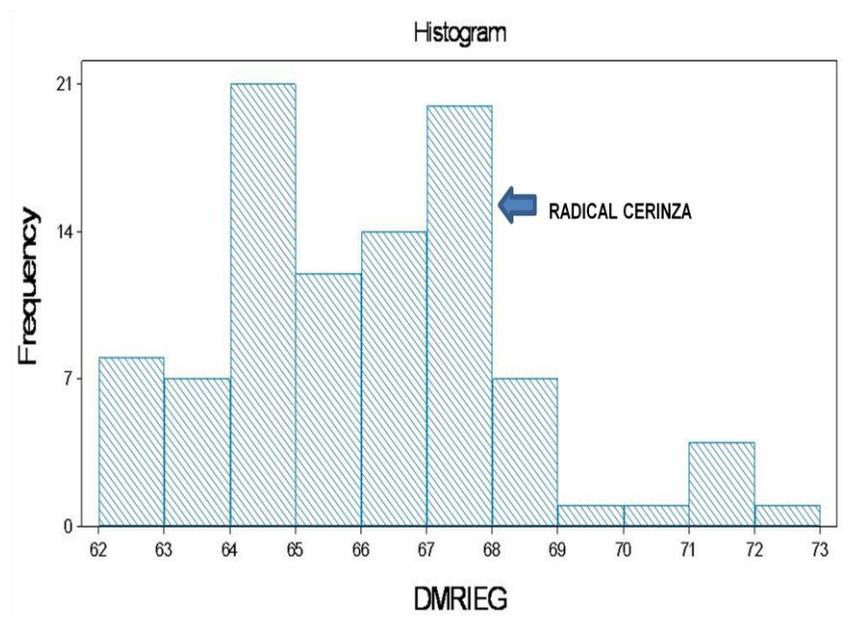


Figura 11: Histograma de días a madurez en condiciones de Riego en la localidad de Palmira

Tabla 11: Análisis de varianza de días a madurez

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	DM Media
0.951655	2.791.009	2.052.833	7.355.167

Fuente	DM	F-Valor	Pr > F
Loc	1	751.02	<.0001
genot	99	5.06	<.0001
Block	1	2'55	0.1136

Como podemos observar en la tabla 11 existe diferencia significativa en los días a madurez entre las dos localidades. Palmira con un promedio en los dos tratamientos de 67 días y Popayán con un promedio de 80 días, datos que son congruentes con lo reportado por Lambers et al., (2000), argumentando que temperaturas bajas reducen la actividad metabólica de la planta, originando una mayor duración de las etapas fenológicas como respuesta a esta condición.

Por otro lado, un estudio realizado por Teran y Singh (2002), reporta una disminución del 3% en el número de días a madurez entre los ambientes de riego y sequía en Palmira Colombia, atribuido a las altas temperaturas, llevando a una aceleración en el proceso de maduración del cultivo.

6.1.3 DÍAS A FLORACIÓN

En condiciones de riego el 28% de la población supero al control Radical cerinza con 32 días a floración, y el promedio de la población fue igual que este. En contraste, en condiciones de sequía el 75% de la población supero a Radical cerinza con una duración de 30 días, pero el promedio de la población solo lo supero en 1 día, sin embargo, a pesar de que riego supero a sequía por dos días, no hay diferencia significativa como se puede observar en la tabla 12.

Tabla 12: Análisis de varianza de días a floración

R-cuadrado	Coef var	Raíz MSE	DF Media
0.958412	2.950.710	1.057.338	3.583.333

Fuente	DF	F-Valor	Pr > F
Localidad	1	642.33	<.0001
Genotipo	99	9.47	<.0001
Bloque	1	0.94	0.3342

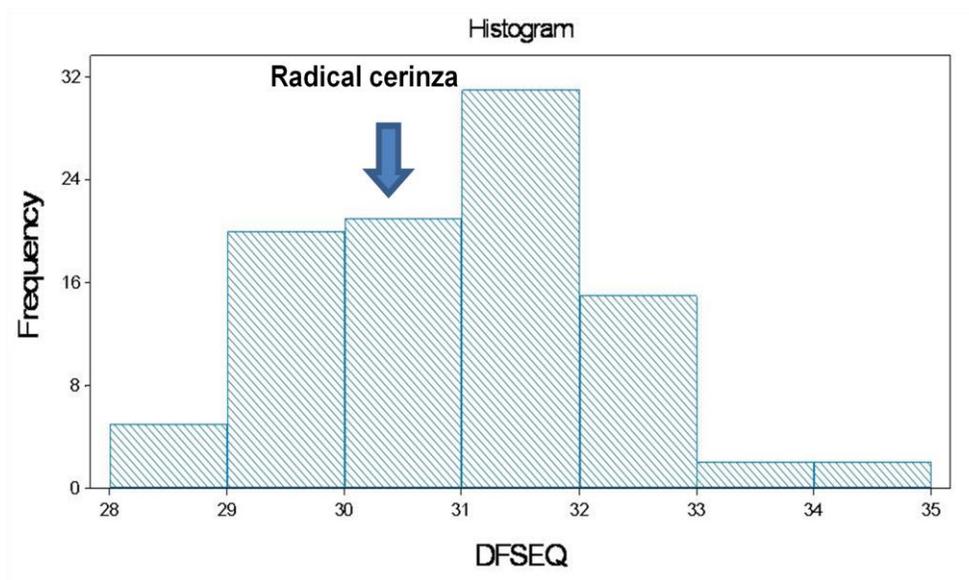


Figura 12: Histograma de días a floración en condiciones de sequía en la localidad de Palmira

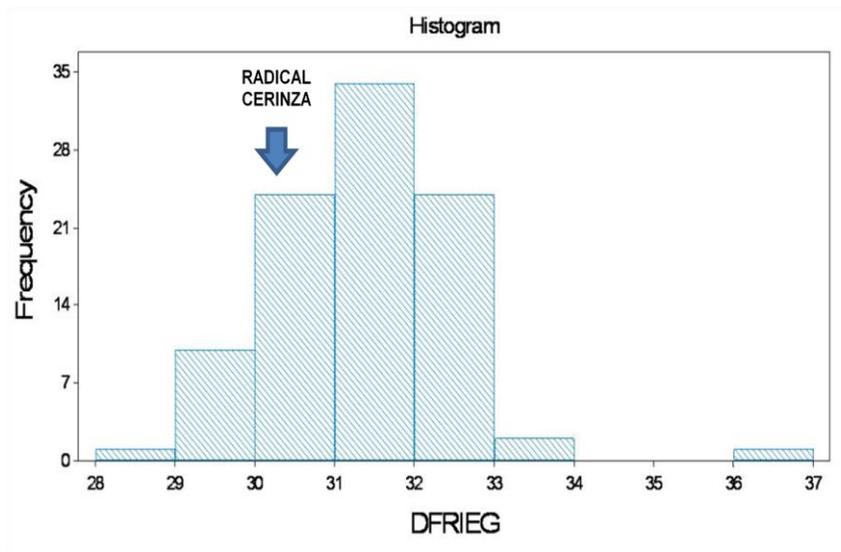


Figura 13: Histograma de días a floración en condiciones de riego en la localidad de Palmira

En Popayán, el 24% de la población supero a Radical cerinza con 38 días a floración, pero el promedio de la población se demoro dos días más en madurar en comparación con el control.

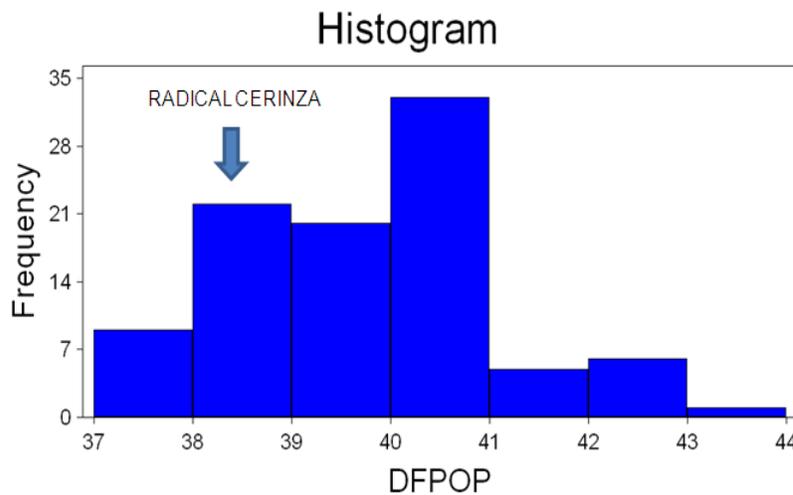


Figura 14: Histograma de días a floración en la localidad de Palmira.

Podemos observar en la tabla 12 que existe diferencia significativa entre las dos localidades, teniendo en cuenta que el Promedio de la población en Palmira bajo condiciones de riego tuvo 32 días a floración y en Popayán 40 días, este fenómeno concuerda por lo reportado por Abebe et al., (1998), quienes dicen que en frijol se presenta un acortamiento en los días a floración por causa del estrés. Además, Machado et al., (2006), asegura que el aumento en los días a floración se debe probablemente a la disminución de la temperatura retrasando los procesos metabólicos de la planta.

6.1.4 PESO POR PLANTA

El 25% de la población supero al control Radical cerinza con un peso por planta de 4.1, y fue superado por el promedio con 0.3 gramos mas. Por otro lado, en condiciones de riego el control Radical cerinza tuvo un peso por planta de 2.6 y fue superado por un 49% de la población con un promedio de 3g y en condiciones de sequía se observo un peso por planta promedio de 3 y de Radical cerinza de 2.8.

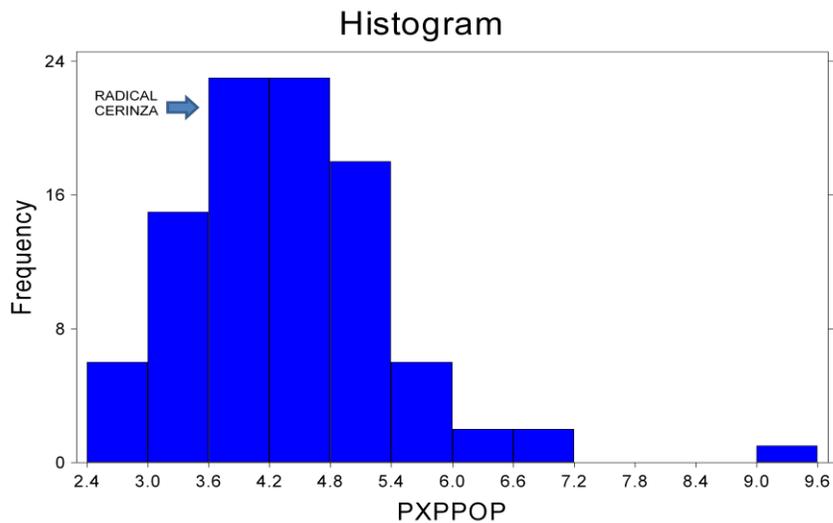


Figura 15: Histograma de peso planta en la localidad de Popayán.

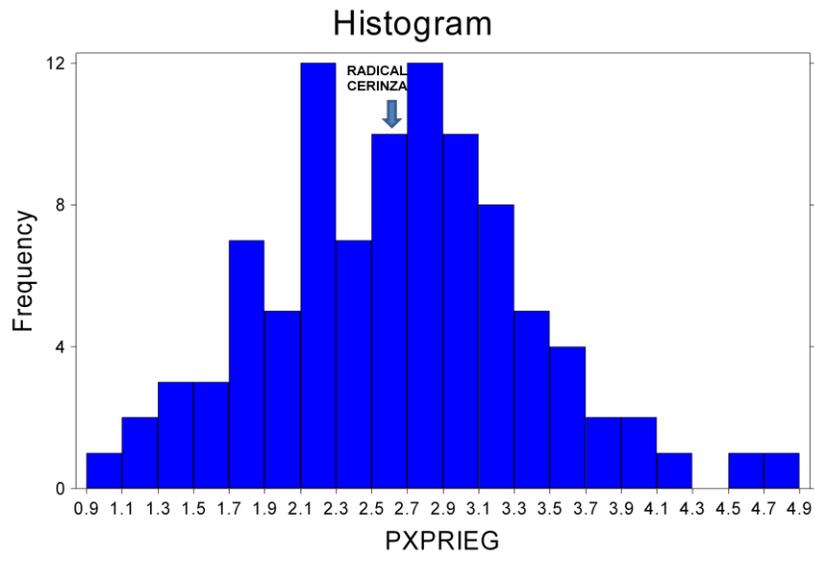


Figura 16: Histograma de peso por planta en condiciones de riego en la localidad de Palmira

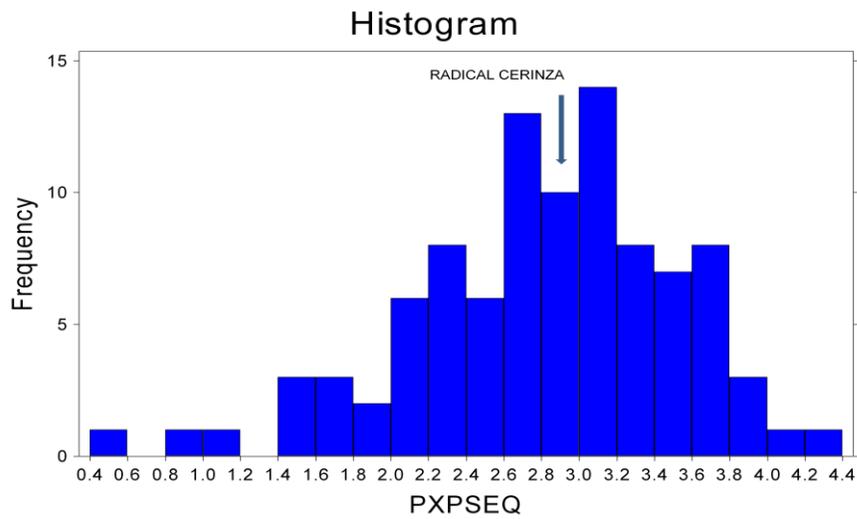


Figura 17: Histograma de peso por planta en condiciones de sequía en la localidad de Palmira

En la tabla 13 podemos observar que existe diferencia significativa entre localidades mas no entre tratamientos, fenómeno que está muy relacionado con lo ocurrido en la característica rendimiento debido al hongo reportado anteriormente, que afecto los rendimientos de la población y por ende el peso por planta en la localidad de Palmira en las condiciones de riego. Por otro lado, se sigue el mismo patrón en Popayán en donde se registraron rendimientos y peso por planta altos gracias a las condiciones ambientales favorables para el cultivo de esta localidad.

Tabla 13: Análisis de varianza de peso por planta

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	pxpl Media
0.710219	3.328.908	1.190.793	3.577.129

Fuente	DF	F-Valor	Pr > F
Loc	1	308.3	<.0001
genot	99	3.02	<.0001
block	1	0.04	0.8352

6.1.5 PESO DE 100 SEMILLAS

Tabla 14: Análisis de varianza de peso de 100 semillas

Fuente	P100S	F-Valor	Pr>F
genot	99	3.7E32	0.0000
Loc	1	0.00	10.000
block	2	0.00	10.000

Como se puede observar en la tabla 14 no existe diferencia significativa entre tratamientos en Palmira, ni entre riego Palmira y Popayán ya que este dato fue tomado realizando una única muestra de cada individuo, reuniendo en una sola muestra una muestra de cada uno de los individuos de cada tratamiento. En los tres tratamientos el promedio de la población es de 53g siendo 9g menor que el control Radical cerinza con 62g, que solo fue superado por el 15% de la población siendo el valor máximo de 70g.

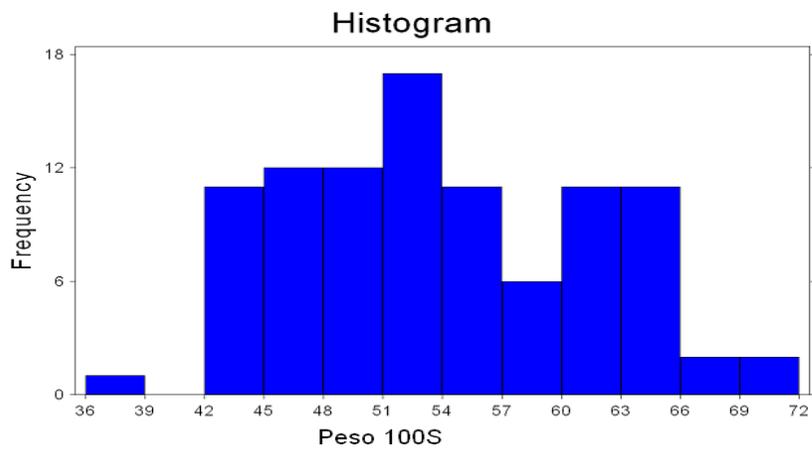


Figura 18: Histograma de peso de 100 semillas en la localidad de Popayán

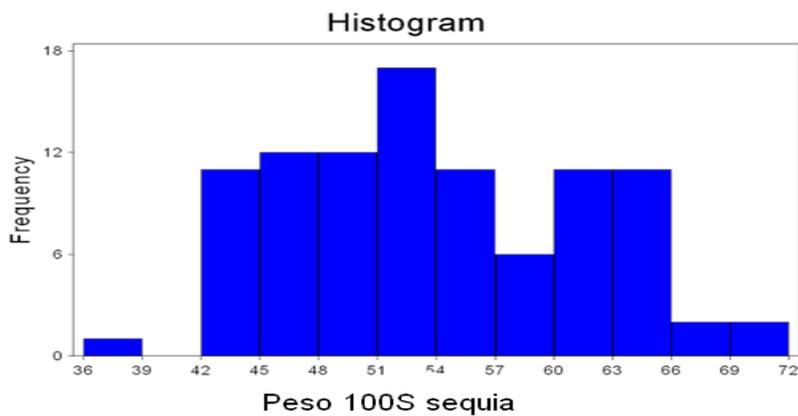


Figura 19: Histograma de peso de 100 semillas en la localidad en condiciones de sequía en la localidad de Palmira

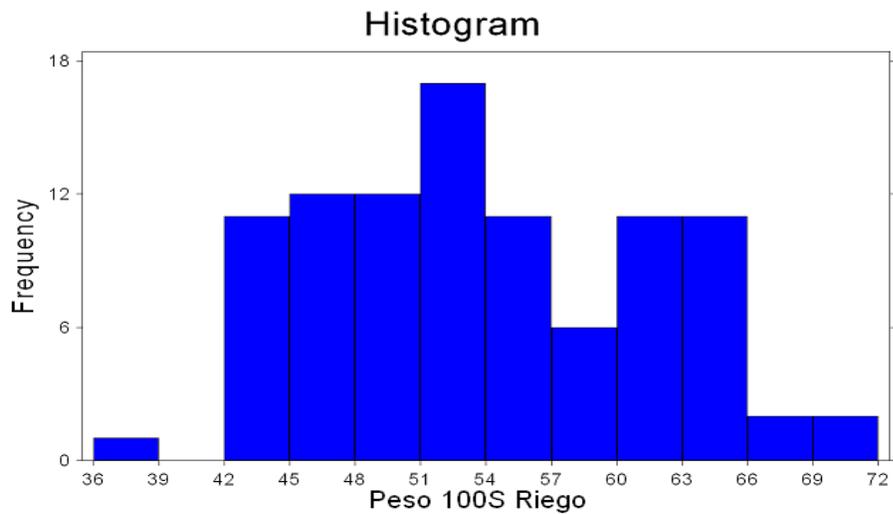


Figura 20: Histograma de peso de 100 semillas en la localidad en condiciones de riego en la localidad de Palmira

6.2 CORRELACIONES PARA LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Para las variables medidas en campo fue posible hallar las correlaciones simples observando correlaciones negativas y positivas entre las características de interés en los distintos ambientes.

Tabla 15: Correlaciones (Pearson) para las variables evaluadas en condiciones de sequía en Palmira

	DF	DM	PESO100S	REND
DM	0.6754			
PESO100S	-0.0604	-0.0263		
REND	-0.3599	-0.3031	0.4007	
PXPLAN	0.028	0.022	-0.0696	-0.078

Tabla 16: Correlaciones (Pearson) para las variables evaluadas en condiciones de riego en Palmira

	DF	DM	PESO100S	PXPLAN
DM	0.1436			
PESO100S	-0.083	0.0053		
PXPLAN	-0.3117	0.0892	0.3464	
REND	0.1073	-0.2771	-0.1353	-0.1223

Como se observa en Palmira en condiciones de sequía existe una correlación positiva alta entre días a floración y días a madurez, fenómeno que reporta Singh.,(1995), indicando que es normal que en condiciones de estrés las plantas presenten una reducción de los días a floración y los días a madurez como mecanismo de resistencia a la sequía por escape. Por otro lado, en Popayán la correlación fue moderada hecho atribuido a temperatura bajas que reducen la actividad metabólica de la planta, originando una mayor duración de las etapas fisiológicas.

Se puede observar una correlación positiva media entre peso de 100 semillas y rendimiento en condiciones de sequía resultado que es comparado con Muñoz et al.,(2006), quienes reportan una correlación positiva pero no significativa entre rendimiento y peso de 100 semillas en condiciones de sequía. En contraste, se puede observar una correlación negativa entre rendimiento y peso de 100 semillas en condiciones de riego, al igual que una correlación poco significativa entre peso de 100 semillas y rendimiento en Popayán, lo que es similar a los resultados encontrados por Teran y Singh.,(2002) quienes reportaron una correlación negativa entre peso de 100 semillas y rendimiento tanto en condiciones de sequía como de riego, soportado en que el rendimiento está en función de número de semillas y al aumentar su número la planta hace una compensación, reduciendo el tamaño de la semilla.

En general se puede considerar que el peso de 100 semillas o tamaño no jugó un papel importante en la consecución del rendimiento obtenido en cada uno de los genotipos evaluados en las dos localidades. También, podemos observar que existe una correlación negativa entre días a floración y días a madurez con rendimiento sequía y peso por planta sequía. Aceptando la versión de Kelly et al.,(1998) que afirma, que en condiciones de altas temperaturas, la aceleración de los días a floración resulta en bajos rendimientos.

Tabla 17: Correlaciones (Pearson) para las variables fenotípicas en Popayán

	REND	DF	DM	PESO100S
DF	-0.0173			
DM	0.0483	0.526		
PESO100S	0.0902	0.0091	0.0038	
PXPLAN	0.8014	0.0294	0.0661	0.0639

El rendimiento en Popayán tuvo una correlación altamente significativa con el peso por planta, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Morales, 1999. Que demuestra, que el peso por planta es un componente fundamental para obtener altos rendimientos, Además, este fenómeno fue favorecido por las condiciones favorables de temperatura de Popayán.

6.3 EVALUACIÓN PARENTAL CON MICROSATELITES

Se evaluaron un total de 285 marcadores reportados como polimórficos en otros estudios (Blair et al., 2003; Blair et al., 2008; Blair et al.,2009;Blair et al.,2010;Gaitan y Solis et al.,2002; Grissi et al., 2007; Yu et al., 2000;Blair et al.,2011), en 9 genotipos de interés para estudio de mapeo genético (Ver anexo D).

Se encontraron un total 132 marcadores genómicos con un porcentaje de polimorfismo del 46% y 152 marcadores génicos con un porcentaje de polimorfismo del 53%, observando un mayor porcentaje de polimorfismo en marcadores génicos para la crusa de interés (G24390 X RADICAL CERINZA), lo que se reitera con el estudio realizado por Blair et al.,(2003), ya que los microsátélites génicos son muy útiles para hallar polimorfismos entre poblaciones contrastantes al encontrarse en regiones codificantes del genoma , mientras que los genómicos son más útiles cuando se trata de encontrar polimorfismos entre poblaciones más relacionadas.

Teniendo en cuenta las diferentes cruza que se evaluaron, se pudo observar que los cruces con un mayor porcentaje de polimorfismo fueron GXR, S16XC143, S48XC143 Y S16XCAL96, S48XC96 mientras que las cruza con menor porcentaje de polimorfismo fueron BXC143 y BXC96 (ver figura 21).

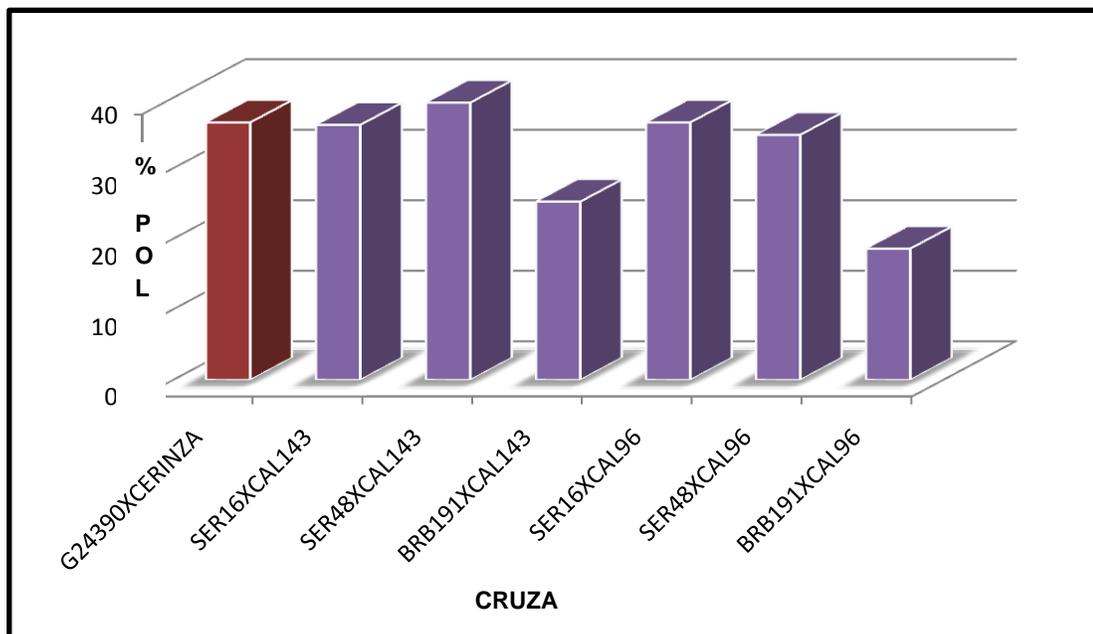


Figura 21: Porcentaje de polimorfismo evaluado en las diferentes cruza.

Fuente: La autora.

De esta manera, se puede observar la variabilidad genética existente entre los diferentes acervos de frijol, en donde las cruces Mesoamericano x Andino presentaron un mayor porcentaje de polimorfismo ya que presentan una base genética más amplia que los cruces entre un mismo acervo (Mesoamericano x Mesoamericano y Andino x Andino), hecho sustentado por Blair et al., (2006), en donde se encontró un nivel de polimorfismo más amplio (59.7%) en combinaciones de poblaciones inter-acervos (Andino x Mesoamericano) que en combinaciones de poblaciones intra-acervos (Andino x Andino) con un porcentaje de polimorfismo del 37.9%. En conclusión para el progreso del mejoramiento basado en una mejora de los componentes de rendimiento es necesario tener padres con un alto rendimiento, ser contrastantes para esta característica y poseer capacidad combinatoria (Singh et al., 1993).

Es importante tener en cuenta los cruces que tuvieron mayor grado de polimorfismo, ya que esto garantiza la identificación de ligamiento con rasgos de interés, brindando la oportunidad de desarrollar mapas de ligamiento de alta calidad y la posibilidad de identificar posibles QTLs de importancia para ampliar la base genética de frijol para futuros estudios de mejoramiento.

6.4 CONSTRUCCIÓN DEL MAPA DE LIGAMIENTO

Se evaluó un total de 285 marcadores microsatélites obteniendo 134 marcadores polimórficos de los cuales solo se pudieron mapear 60 marcadores debido a problemas de amplificación y dificultad en la lectura. Para la construcción del mapa se tuvo en cuenta la ubicación de los microsatélites en los mapas previos a este estudio de la población DOR364XG19833 (Blair et al., 2003; Blair et al., 2008 y Natalia Hurtado (sin publicar) y BAT93 X JALOEPP558 (Grisi, 2007).

Se construyo un mapa de ligamiento con toda la población (276 individuos) y 60 marcadores microsátélites, en el cual se establecieron 11 grupos de ligamiento reportados para frijol con un tamaño total de 533.88 cM, estos grupos tuvieron una longitud promedio de 48.53 cM, con una longitud promedio entre marcadores de 8.89 cM.

Tabla 18: Resumen del mapa de ligamiento con 270 individuos de la población G24390 x Radical cerinza.

GL	Microsátélites	Distancia total en cM	Distancia promedio en cM
1	6	45.61	7.6
2	6	63.89	10.64
3	6	40.81	6.8
4	7	80.91	11.55
5	4	20.30	5.07
6	4	29.33	7.33
7	6	54.24	10.70
8	5	42.25	8.45
9	9	93.92	10.43
10	2	16.8	16.8
11	5	45.82	9.164

Como se puede observar en la tabla 18 el grupo de ligamiento que presento una mayor longitud con 93.92 cM fue el grupo 9 con 9 marcadores, al igual que el grupo de ligamiento 4 con 80.91cM y 7 marcadores. En contraste el grupo de ligamiento que menor longitud presento fue el grupo 10 con 16.8 cM y solo 2 marcadores, seguido por el grupo de ligamiento 5 con un tamaño de 20.30 cM y 4 marcadores.

Map of Group: 1 (BC1)

Map size : 44.43 cM

Map of Group: 2 (BC2)

Map size : 60.98 cM

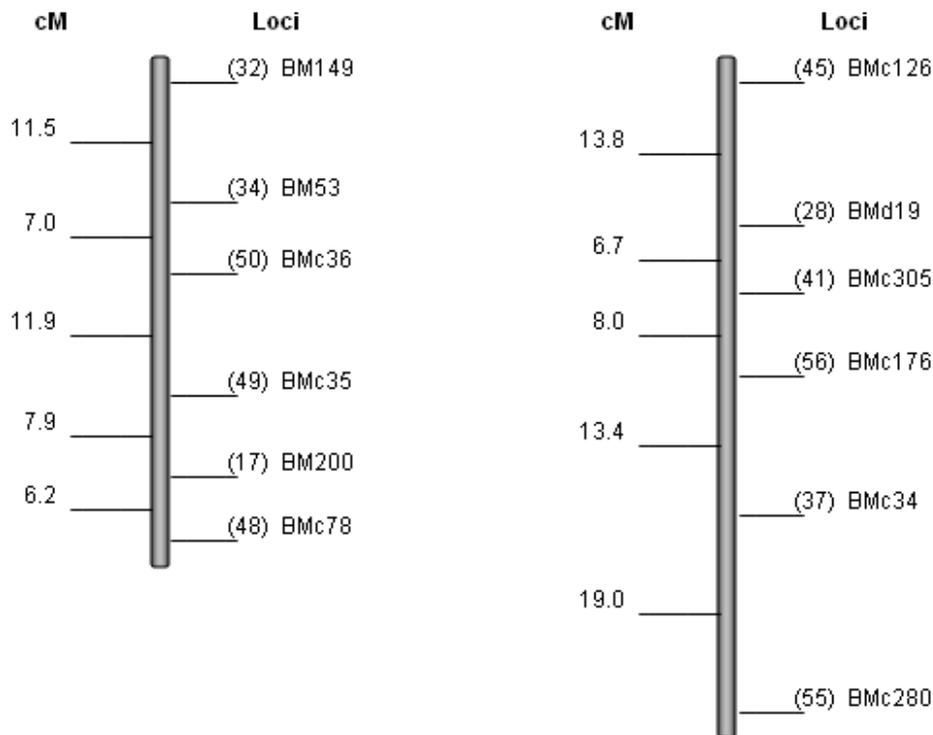
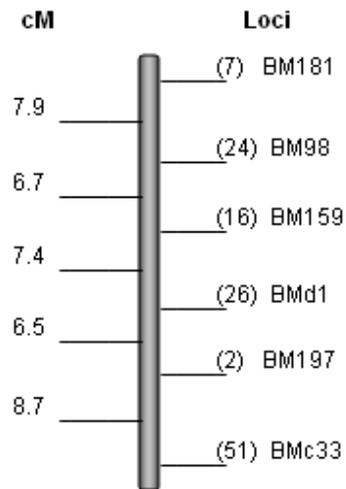


Figura 22: Mapa de ligamiento con 276 individuos de la población G24390 X Radical cerinza

Map of Group: 3 (BC3)

Map size : 37.23 cM



Map of Group: 4 (BC4)

Map size : 80.98 cM

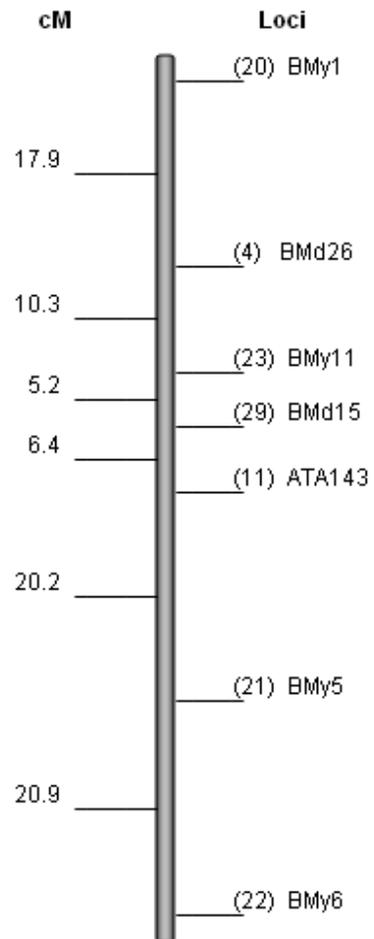
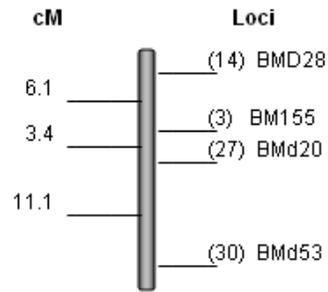


Figura 23: Mapa de ligamiento con 276 marcadores de la población G24390 X Radical cerinza.

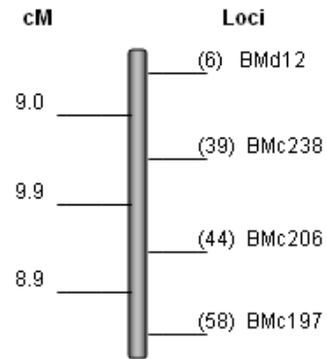
Map of Group: 5 (BC5)

Map size : 20.62 cM



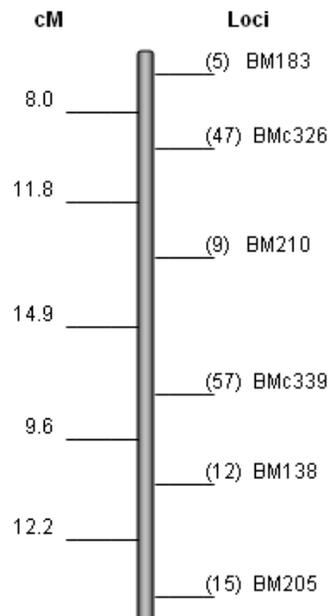
Map of Group: 6 (BC6)

Map size : 27.91 cM



Map of Group: 7 (BC7)

Map size : 56.50 cM



Map of Group: 8 (BC8)

Map size : 40.56 cM

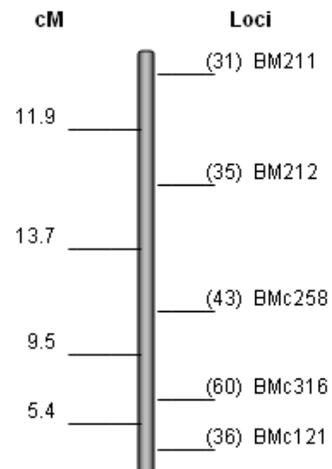


Figura 24: Mapa de ligamiento con 276 individuos de la población G24390 X Radical cerinza

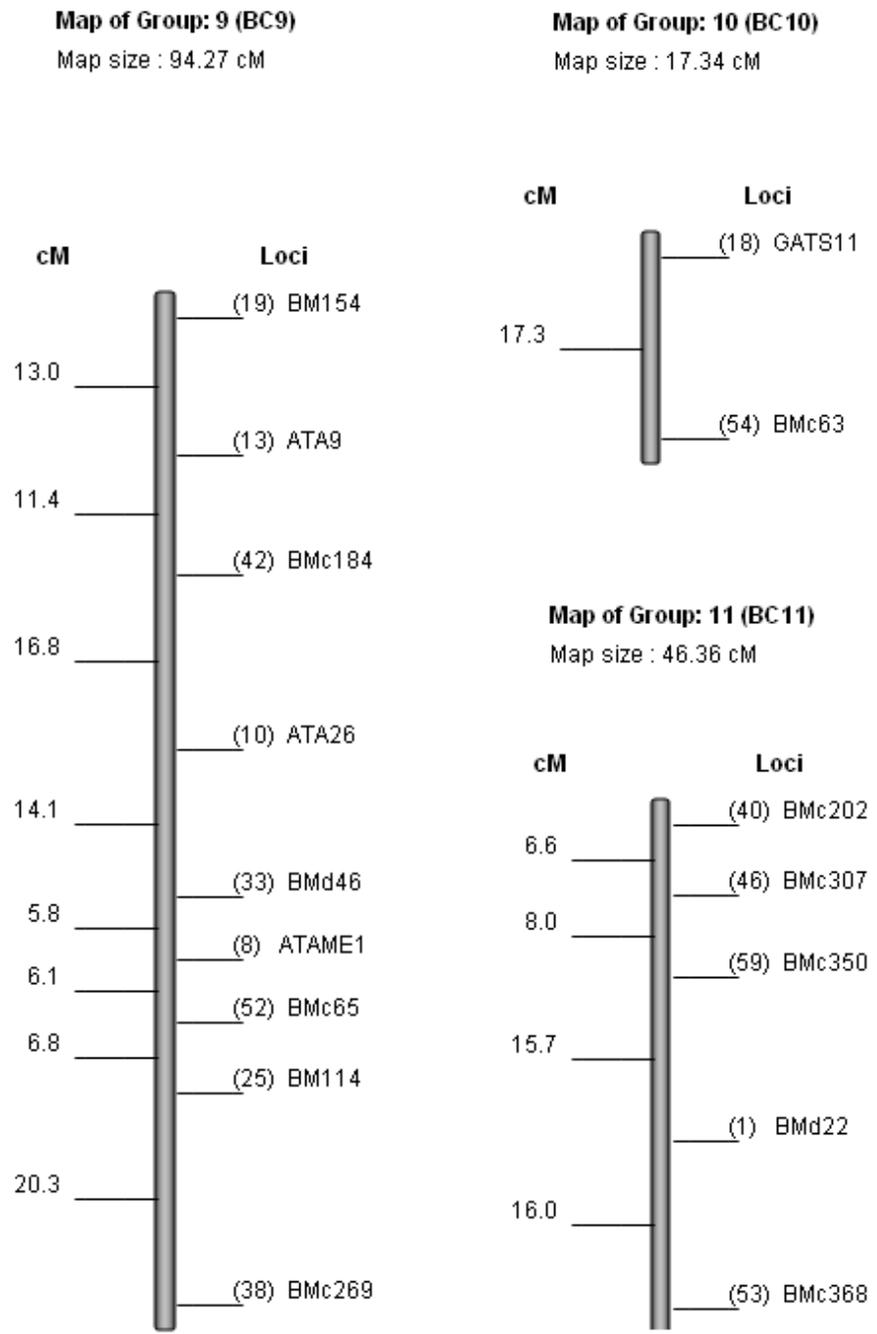


Figura 25: Mapa de ligamiento con 276 individuos de la población G24390 X Radical cerinza.

Posteriormente se construyo un mapa de ligamiento con solo 96 individuos (individuos que tiene información fenotípica) y un total de 60 microsatélites con el fin de identificar los QTLs, obteniendo un mapa de ligamiento con un tamaño de 350.44 cM, en el cual se establecieron los 11 grupos de ligamiento reportados para frijol, con una longitud promedio de 32.60 cM y una distancia promedio entre marcadores de 5.97cM

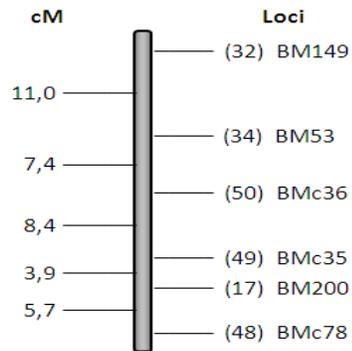
Tabla 19: Resumen del mapa de ligamiento con 96 individuos de la población G24390 x Radical cerinza.

GL	Microsatélites	Distancia total en cM	Distancia promedio en cM
1	6	36.43	6.07
2	6	34.48	5.74
3	6	36.71	6.11
4	7	45.03	6.43
5	4	11.09	2.77
6	4	14.5	3.62
7	6	23.39	3.89
8	5	17.08	3.41
9	9	94.25	10.47
10	2	15.68	7.84
11	5	21.81	4.36

El grupo de ligamiento 9 fue el que tuvo mayor longitud con 94.25 cM, además de ser uno de los grupos de ligamiento que presentaron un mayor número de marcadores (10), al igual que el grupo 4 con 7 marcadores. Por otro lado, el grupo de ligamiento que menor longitud (15.68cM) tuvo fue el 10 con solo con 2 marcadores, seguido por el grupo de ligamiento 5 y 6 con solo 4 marcadores.

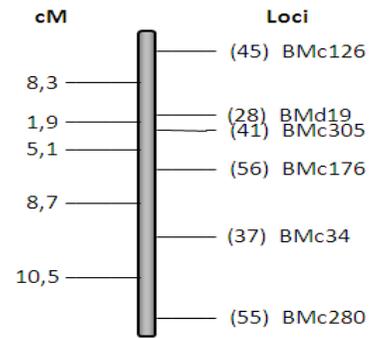
Map of Group: 1 (BC1)

Map size : 36,43 cM



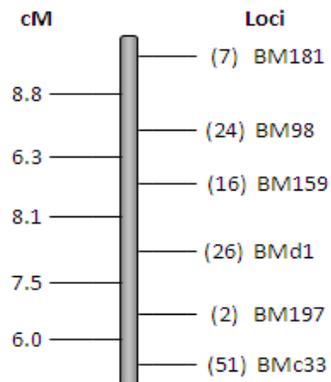
Map of Group: 2 (BC2)

Map size : 34,48 cM



Map of Group: 3 (BC3)

Map size : 36.71 cM



Map of Group: 4 (BC4)

Map size : 45.03 cM

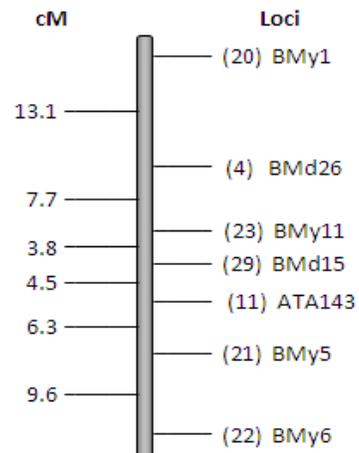
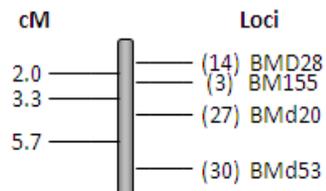
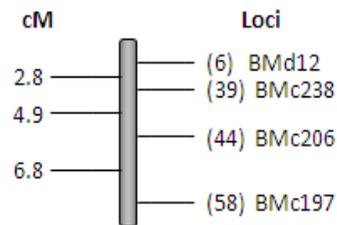


Figura 26: Mapa de ligamiento con 96 individuos de la población Radical cerinza x G24390

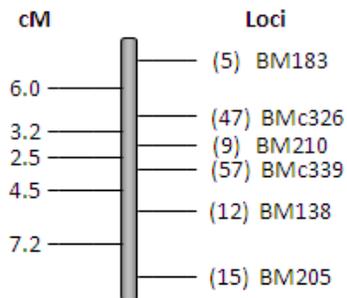
Map of Group: 5 (BC5)
Map size : 11.09 cM



Map of Group: 6 (BC6)
Map size : 14.50 cM



Map of Group: 7 (BC7)
Map size : 23.39 cM



Map of Group: 8 (BC8)
Map size : 17.08 cM

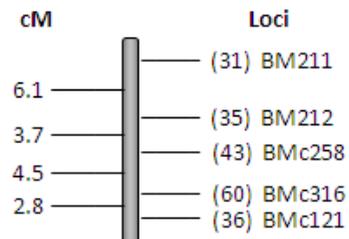
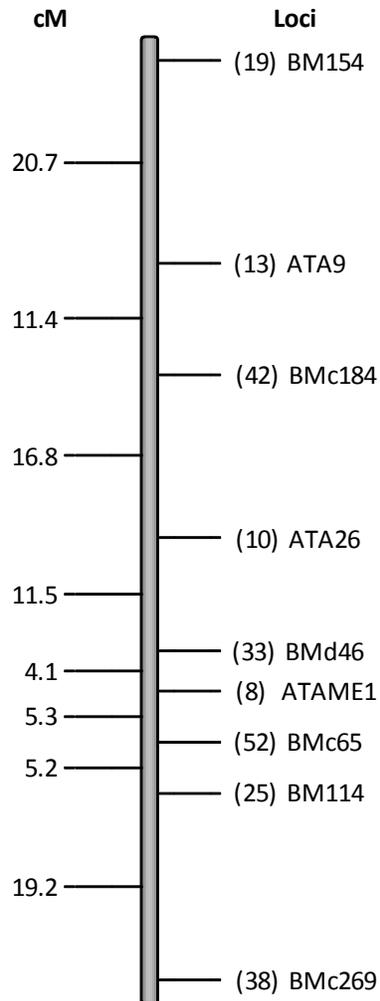


Figura 27: Mapa de ligamiento con 96 individuos de la población Radical cerinza x G24390

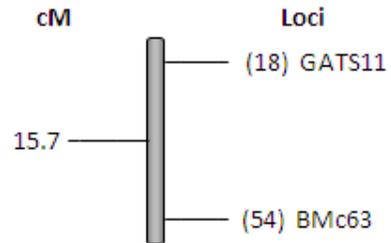
Map of Group: 9 (BC9)

Map size : 94.25 cM



Map of Group: 10 (BC10)

Map size : 15.68 cM



Map of Group: 11 (BC11)

Map size : 21.81 cM

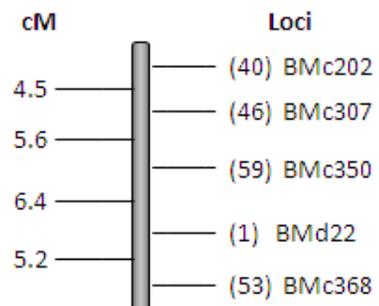


Figura 28: Mapa de ligamiento con 96 individuos de la población G24390 x Radical cerinza.

6.5 COMPARACION ENTRE EL MAPA DE LIGAMIENTO CON 276 INDIVIDUOS Y EL MAPA CON 96 INDIVIDUOS

De la gran cantidad de mapas de ligamiento reportados para frijol común, actualmente el de mayor saturación y utilidad es el mapa de la población DOR364XG19833 que tiene una longitud total de 1720cM (Blair et al., 2003).

Al comparar la longitud total del mapa de ligamiento de D X G con el mapa en el que se utilizaron 276 individuos, se observa que se presenta una cobertura mayor correspondiente al 31.039%, en contraste con el mapa de 96 individuos en el que solo se obtuvo una cobertura del 20.27% del mapa de DOR364XG19833, hecho que es argumentado por Semagn. K et al., (2006), quienes reportan que las distancias entre dos marcadores es dada por el numero de recombinaciones que halla entre ellos, así al tener un mayor número de individuos que según lo reportado por Ferreira et al (2006), un total de 200 es lo requerido para construir un mapa de ligamiento razonable, se pueden evaluar mas recombinaciones entre marcadores y de esta manera obtener distancias mas exactas y por ende una mejor resolución del mapa. Por consiguiente, el mapa en el que se evaluaron un mayor número de líneas tiene una cobertura mayor del mapa referencia debido a que muestra distancias más precisas entre marcadores y por ende una similaridad mayor con este.

6.5 DISTORSIÓN DE LA SEGREGACION

La distorsión de los marcadores fue evaluada por medio de la prueba X^2 usando la proporción genotípica esperada para una población de RC_2F_2 (81.25%RR, 12.5 RG, 6.25 GG), donde se observó que el 87% de los marcadores se comportó según lo esperado y el 11% de la población presentó un sesgo hacia Radical cerinza y el 2% hacia el silvestre G24390.

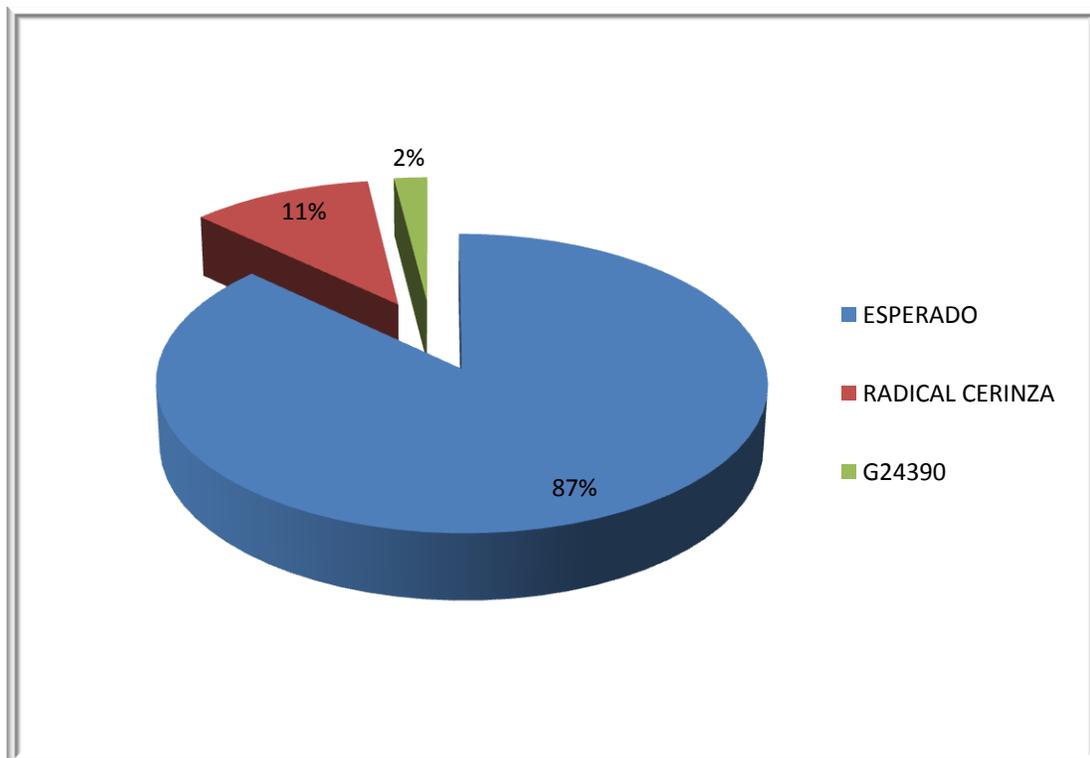


Figura 29: Distorsión de la segregación de los microsatélites evaluados en la población Radical cerinza x G24390

Tabla 20: Microsatélites con distorsión en la segregación

RADICAL CERINZA		G24390	
GL	SSR	GL	SSR
3	ATA26	4	Bmy1
3	BM98	9	Bmc184
6	Bmc238		
8	Bmc258		
2	Bmc280		

El grupo de ligamiento que presento mayor distorsión de la segregación fue el 3 con 2 marcadores sesgados hacia el padre recurrente (ver tabla 20), además en el grupo de ligamiento 4 y 9 se presentaron marcadores sesgados hacia el padre silvestre.

La tasa de distorsión parece estar relacionada con causas diversas, como el incremento en la divergencia genética entre las líneas progenitoras (Quillet *et al.*, 1995), irregularidades meióticas en la transmisión de los factores genéticos (Masuelii *et al.*, 1995), selección gamética o cigótica (Kreike y Stiekema, 1997) y apareamiento preferencial entre genomas homólogos (Nybom *et al.*, 2004).

Además, a factores biológicos como selección natural durante la fertilización, crecimiento de la planta, gametogénesis y desarrollo de semillas (Jung *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1997; Nacagahra, 1972; Harushima *et al.*, 1996; Garris *et al.*, 2003), por otro lado el tipo de cruce también es un factor de gran importancia ya que por ser una retrocruza la proporción genómica está muy sesgada hacia un parental sobre todo cuando se involucra en la cruce un material silvestre con características agronómicas no deseadas (Chen *et al.*, 2006 y Blair *et al.*, 2002) factores que influyen en que las proporciones esperadas según las leyes de Mendel no sean como los valores establecidos para la segregación en una población.

2.6 ANALISIS DE QTLs

El análisis de QTLs se realizó con el programa QGene v. 4.0 con la opción de análisis de marcador simple y por el programa QTL cartographer v 2.5 mediante el análisis de intervalo compuesto.

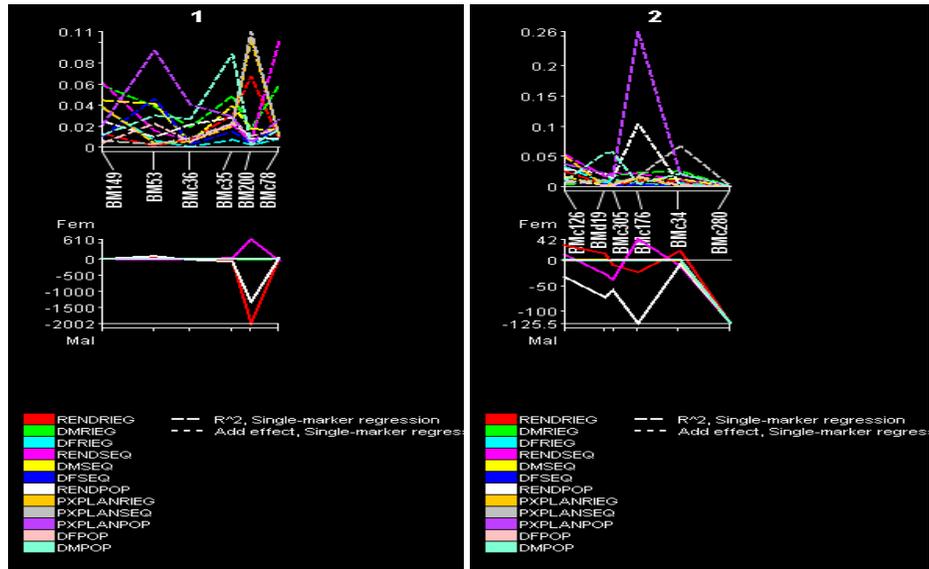
2.6.1 Análisis de QTLs por marcador simple

Mediante el análisis por marcador simple se identificaron un total de 57 marcadores asociados a los rasgos fenotípicos observados (Ver tabla 21).

Tabla 21: Análisis de QTLs por medio de análisis de marcador simple

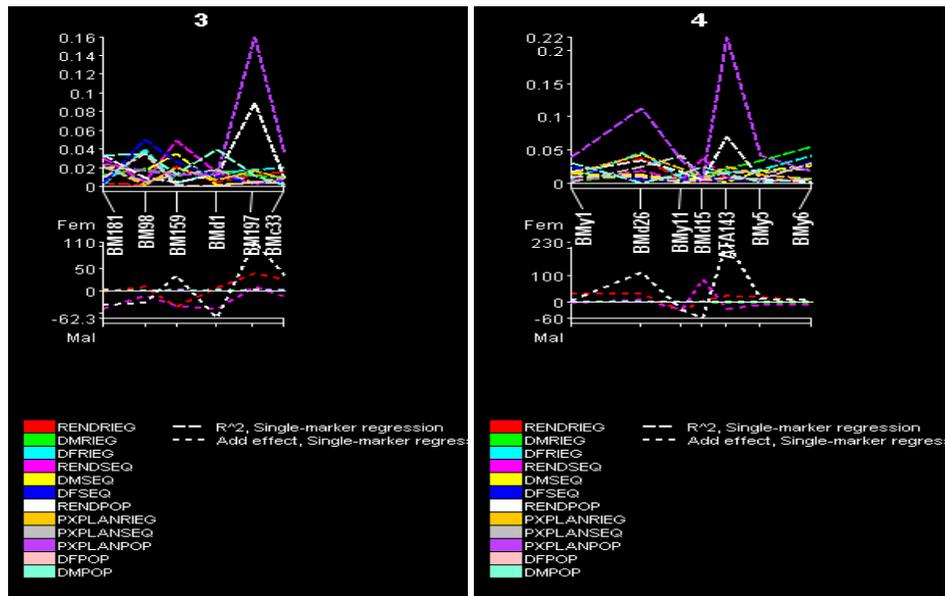
CARACTER	GL	SSR	SMR (ADD EFFECT)	SMR (R ²)
DFPOP	11	BMc368	0,41	0,069
	7	BMc339	1,312	0,079
DFRIEG	9	ATA9	0,408	0,054
	9	BMd46	0,9	0,077
DFSEQ	5	BMd53	0,851	0,056
	9	ATA26	-0,699	0,058
	9	BMd46	0,804	0,051
DMPOP	1	BMc35	0,027	0,088
	2	BMd19	-1,128	0,055
	2	BMc305	-1,077	0,056
	5	BMD28	-1,434	0,057
	9	ATA26	-0,963	0,057
	9	BMc65	0,501	0,052
DMRIEG	1	BM149	-0,961	0,059
	1	BMc78	1,201	0,059
	11	BMc202	1,183	0,064
	11	BMc307	1,771	0,062
	4	BMy6	-1,001	0,055
DMSEQ	5	BMd53	1,705	0,073
	6	BMc206	-2,629	0,058
	9	BM114	-0,737	0,075
	9	BMc269	-0,84	0,067

PXPLANPOP	1	BM53	1,326	0,092
	11	BMd22	0,977	0,077
	11	BMc368	0,78	0,085
	2	BMc176	-0,616	0,257
	3	BM197	1,262	0,159
	4	BMd26	1,211	0,113
	4	ATA143	2,351	0,219
	6	BMd12	0,708	0,056
	6	BMc238	1,132	0,096
	9	ATAME1	1,529	0,169
	9	BMc269	-0,027	0,066
PXPLANRIEG	1	BM200	-12,1	0,103
	11	BMc307	-0,643	0,063
	2	BMc126	0,292	0,051
	6	BMc197	0,508	0,058
	7	BM183	-0,344	0,05
PXPLANSEQ	11	BMc350	-0,622	0,057
	11	BMd22	-0,531	0,072
	1	BM200	-19,981	0,11
	2	BMc34	0,337	0,066
RENDPOP	2	BMc176	-125,481	0,104
	3	BM197	107,981	0,089
	4	ATA143	223,375	0,07
	8	BM211	88,26	0,072
	8	BM212	-1,482,971	0,059
RENDRIEG	8	BMc258	-139,064	0,069
	9	ATAME1	142,553	0,053
	1	BM200	-2,001,064	0,067
	11	BMc307	-93,88	0,077
	8	BM211	39,747	0,061
RENDSEQ	1	BM149	-13,047	0,061
	11	BMc307	-78,417	0,058
	2	BMc126	12,422	0,053
	7	BM183	-67,372	0,076
	9	BMd46	-75,329	0,078



CROMOSOMA 1

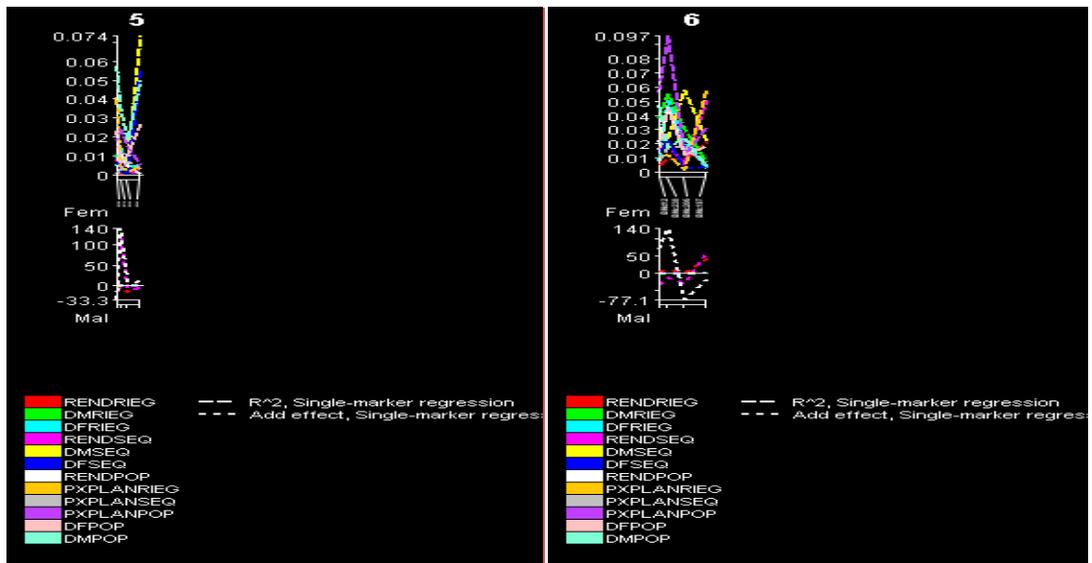
CROMOSOMA 2



CROMOSOMA 3

CROMOSOMA 4

Figura 30: Análisis de marcador simple por medio del programa QGene v 4.0



CROMOSOMA 5

CROMOSOMA 6

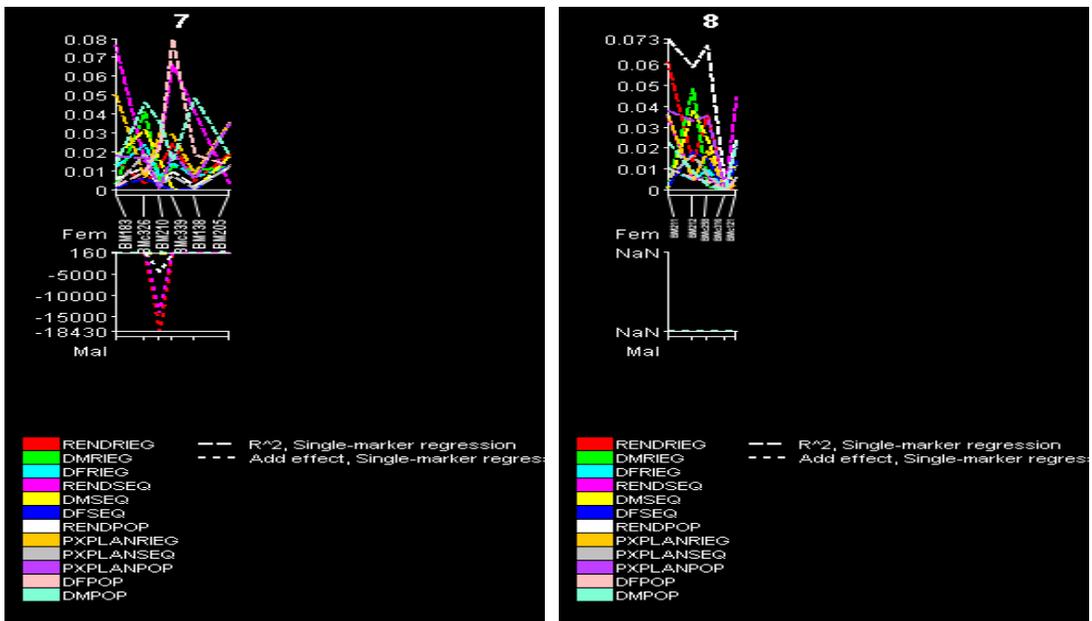
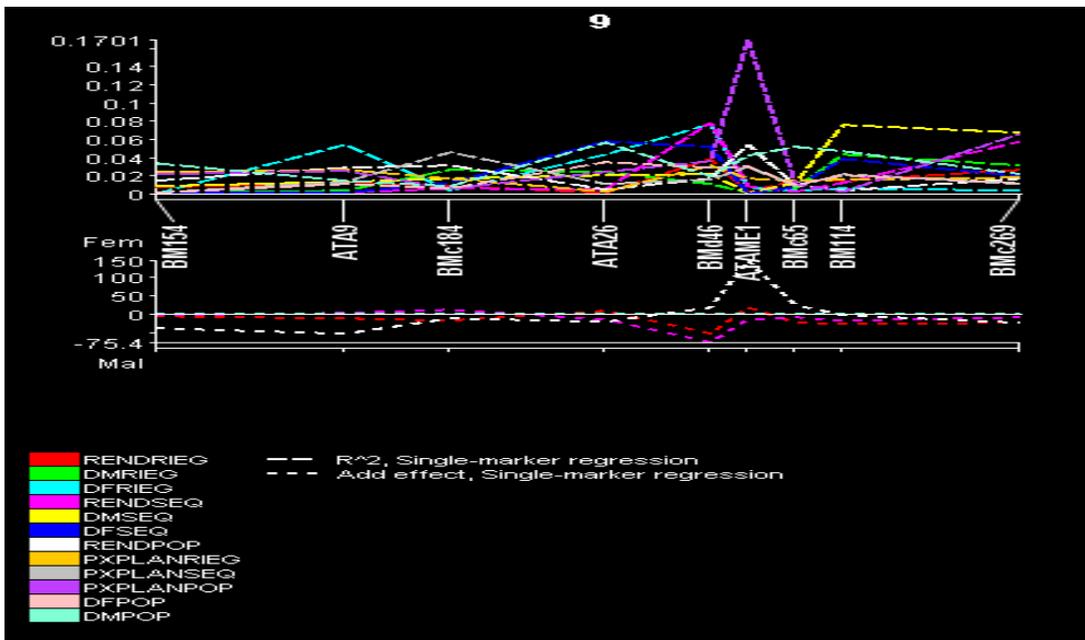
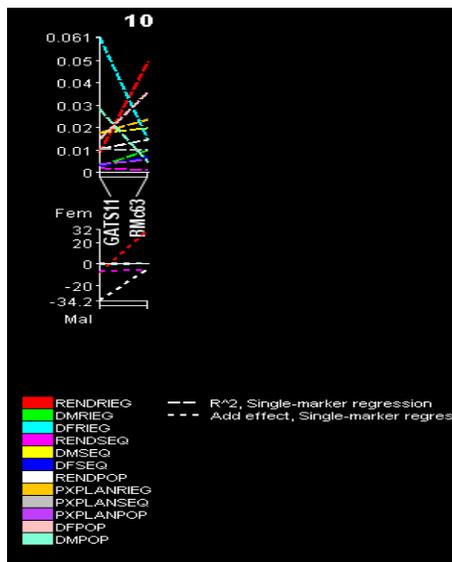


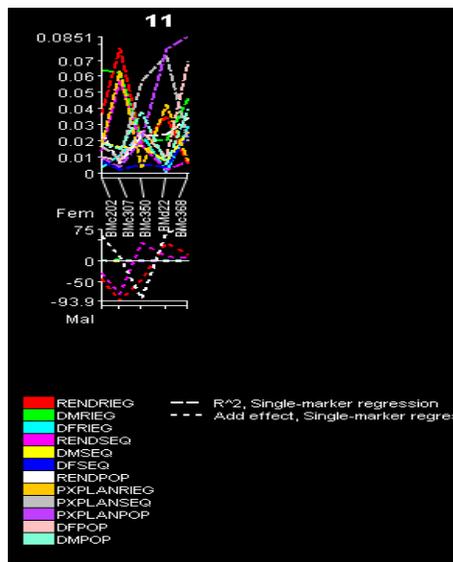
Figura 31: Análisis de marcador simple por medio del programa QGene v 4.0



CROMOSOMA 9



CROMOSOMA 10



CROMOSOMA 11

Figura 32: Análisis de marcador simple por medio del programa QGene v 4.0

- **Días a floración**

Los días a floración mostraron una asociación con 7 marcadores, 2 en Popayán y 5 en Palmira, en los grupos de ligamiento 5, 7,9 y 11 que explican entre el 5 y 10% de la variación fenotípica, causada por los alelos del padre cultivar, a excepción del marcador ATA 26 que presenta variación gracias al padre silvestre G24390.

- **Días a madurez**

Se encontró asociación con 6 marcadores en la localidad de Popayán en los grupos de ligamiento 1, 2,5 y 9; 5 en Palmira en condiciones de Riego en los grupos de ligamiento 1,4 y 11 y 4 en condiciones de sequía en los grupos de ligamiento 5, 6 y 9.

El marcador Bmc35 localizado en el cromosoma 1, explico el 8.8% de la variación fenotípica en la localidad de Palmira, atribuido a Radical cerinza.

- **Peso por planta**

En los cromosomas 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 9 se encontraron marcadores asociados a esta característica, que explican entre el 5 y 23% de la variación fenotípica. Entre los que resaltan en la localidad de Popayán el marcador BMc176 en el cromosoma 2 explicando una variación fenotípica del 25.7% atribuida al padre silvestre, el ATA143 ubicado en el cromosoma 4 que explica el 22.9% de la variación atribuida al padre cultivar. En condiciones de riego y sequía fue consistente el marcador BM200 en el grupo de ligamiento 1 explicando el 10% de la variación en riego y el 11% en sequía atribuida en los dos casos al padre silvestre, convirtiéndose en un sitio de interés para estudiar la expresión de este rasgo.

- **Rendimiento**

Se identificaron un total de 15 asociaciones para esta característica, entre las que se destaca el marcador Bmc176 explicando el 10.4% de la variación fenotípica atribuida al silvestre, para este rasgo en la localidad de Popayán. Siendo consistente esta asociación con peso por planta con el mismo marcador, apoyando la alta correlación existente entre estas dos características en esta localidad.

2.6.2 Análisis de QTL por intervalo compuesto

Por medio del programa QTL Cartographer v.1.21 fueron identificados un total de 9 QTLs para 3 de las 12 características evaluadas en este estudio. La nomenclatura se asignó según Taran et al, (2002) donde se enuncia el nombre de la característica, el grupo de ligamiento y el número de QTLs encontrados en ese grupo.

El rasgo que más asociación tuvo con los marcadores fue el Rendimiento en la localidad de Popayán, hay que resaltar el QTL (REND4,1) ubicado en el grupo de ligamiento 4 ya que presentó el mayor porcentaje de variabilidad explicando el 58% para este rasgo aportado por el cultivar. Igualmente, en este mismo grupo de ligamiento encontramos otro QTL para esta característica que explica el 21% de la variación fenotípica aportada por el padre silvestre. También se encontró un QTL ubicado en el grupo de ligamiento 2 (REND2,1) que explica el 5% de la variación fenotípica aportada por el silvestre. En el grupo de ligamiento 3 se identificó el QTL (REN3,1) que explica el 18% de la variación fenotípica atribuida por el cultivar y por último se identificó en el grupo de ligamiento 11 el QTL (REND11,1) con un porcentaje de variación del 19% atribuida por el padre cultivar Radical cerinza. La ubicación de los QTLs ubicados en el cromosoma 4 concuerda con lo reportado por Iriarte, G (2002) encontrando también 2 QTLs para rendimiento en este mismo grupo de ligamiento.

Por otro lado, se encontraron 3 QTLs asociados a la característica peso por planta: en el grupo de ligamiento 2 (PXP2,2) que explica el 25% de la variación fenotípica dada por el padre silvestre, en el grupo de ligamiento 3 (PXP3,2) explicando el 34% de la variación fenotípica atribuida al padre cultivar y en el grupo de ligamiento 11 (PXP11,2) que explica el 34% de la variación fenotípica atribuida al cultivar. El QTL identificado en el grupo de ligamiento 2 en este estudio concuerda con el reportado por Izquierdo, P (2010), quien identificó un QTL para peso por planta (PXP2,1) en este mismo cromosoma.

Hay que tener en cuenta que los QTLs encontrados en Rendimiento Popayán y Peso por planta Popayán están asociados a los mismos marcadores en los mismos cromosomas, lo que verifica la alta correlación existente entre estas dos características en esta localidad. Por otro lado, también se identificó un QTL asociado a la característica días a madurez (DM1,1), en el grupo de ligamiento 1 con un porcentaje de variación fenotípica del 10% aportada por el padre silvestre G24390.

En términos generales, se observa introgresión del material silvestre en algunas características de importancia agronómica como en el incremento del peso por planta y por ende el rendimiento, por consiguiente, se puede decir que la mayor parte de alelos silvestre representaron un aporte positivo en la población desarrollada, llevando a la conclusión de la importancia de incluir accesiones silvestres en programas de mejoramiento (ver tabla 22)

Tabla 22: Análisis de QTLs por intervalo compuesto

CARACTERISTIC A	GL	MARCADO R	POSICION	LR	FUENTE	ADITIVIDAD	R2	TR2	S1
RENDIMIENTO POPAYAN	2	BMc176	0.1529	18.7046042	G24390	-130.2212341	0.0428612	0.0731582	1.6584196
	3	BM197	0.3269	17.0530045	RADICAL	124.071808	0.1856992	0.2241096	12.275.984
	4	ATA143	0.3012	25.3943124	RADICAL	562.5919505	0.5390994	0.5827130	0.6505363
	4	BMy5	0.3941	19.6995655	G24390	-179.9523424	0.2100107	0.2536243	11.6157416
	11	BMc350	0.1516	15.8488844	RADICAL	133.947110	0.1969194	0.2405329	1.530767
PESO X PLANTA POPAYAN	2	BMc176	0.1529	29.9344477	G24390	-0.6398344	0.2561320	0.3348893	21.7571400
	3	BM197	0.3269	35.8831922	RADICAL	3.2464892	0.3435657	0.3601791	2.7598558
	11	BMc350	0.1516	28.6178488	RADICAL	3.9465729	0.2824438	0.3634147	1.4081648
DIAS A MADUREZ POPAYAN	1	BMc36	0.2681	17.9316225	G234390	-0.0443338	0.1023814	0.1272813	15.0517500

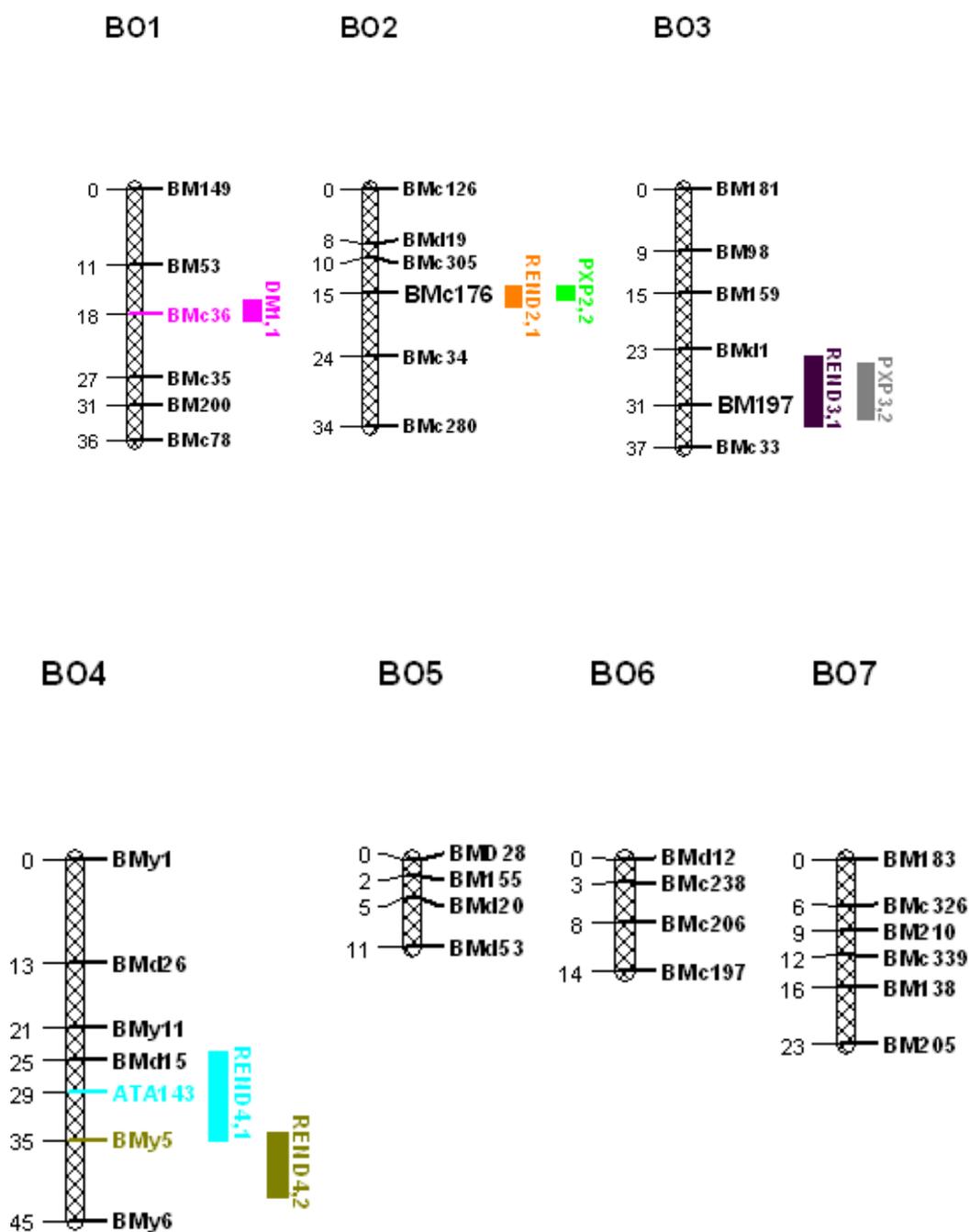


Figura 33: Analisis de QTLs por mapeo por intervalo compuesto. Grafica realizada en MapChart v.2.2.

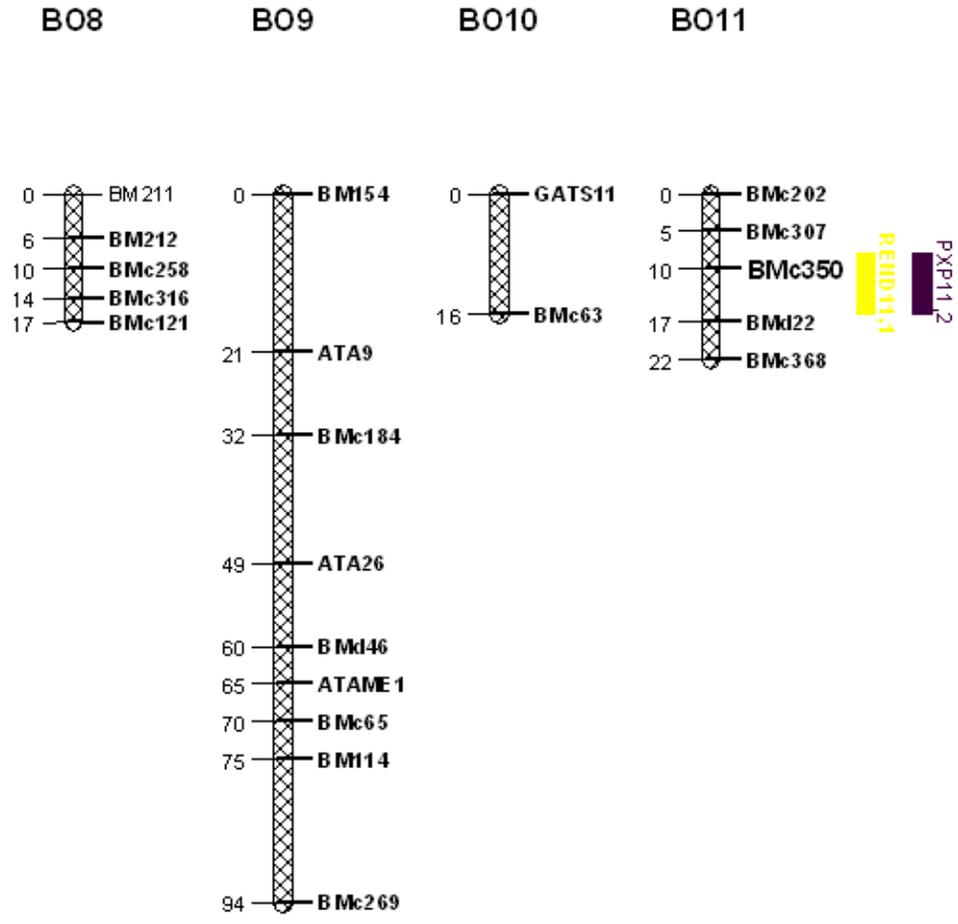


Figura 34: Análisis de QTLs por mapeo por intervalo compuesto. Grafica realizada en MapChart v.2.2.

2.7 ANALISIS DE INTROGRESION GENETICA

El análisis de introgresión se realizó por medio del programa CSSL V. 0.5.3 en el cual se halló el porcentaje de introgresión y el número de segmentos introgresados en cada una de las líneas de la población. Se puede ver que los individuos de la población poseen un porcentaje del genoma recurrente promedio del 5.77% con un porcentaje mínimo del 0% y un máximo del 34.12%. Por otro lado, el promedio del porcentaje del genoma donador es del 89.59% desde un mínimo del 58.36% y un máximo del 100%, el promedio del porcentaje de heterocigotos es del 3,78% con porcentaje mínimo del 0% y un máximo del 27,70% (ver tabla 23).

Tabla 23: Proporción genómica de la población Radical cerinza x G24390

	# de segmentos de G24390	% genoma recurrente	% genoma G24390	% genoma heterocigotos
Min	8	0,00	58.36	0,00
Max	20	34,12	100,00	27,70
Promedio	12,87	5,77	89,59	3,78
Sum	3551			

El número promedio de fragmentos donadores introgresados en las líneas fue del 5.77 variando entre un mínimo de 8 a un máximo de 20 fragmentos (ver figura 35).

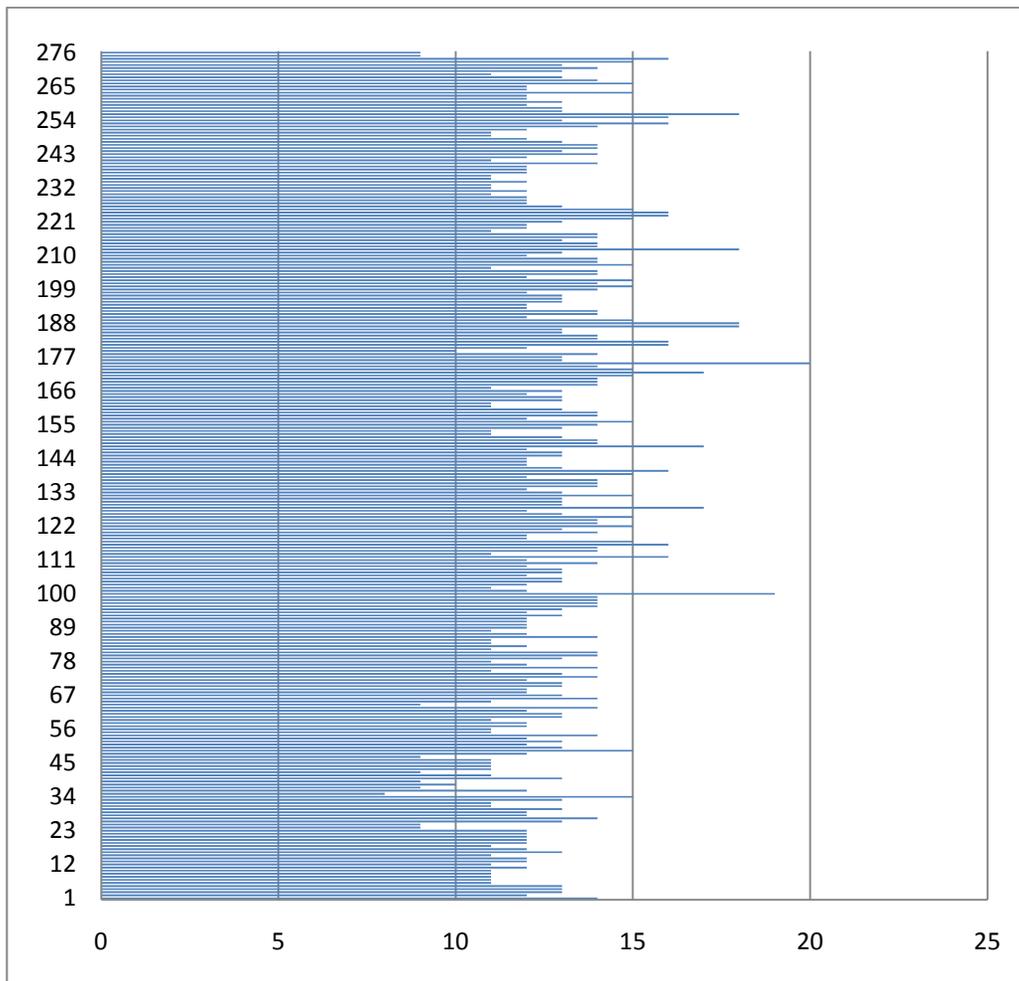


Figura 35: Numero de segmentos de introgresión por línea.

2.7.1 Asociación de microsatélites con las características fenotípicas

Por medio del programa CCSSL Finder v 0.5.3 se buscaron marcadores que estuvieran asociados a características fenotípicas en las líneas que presentaron datos extremos, incluyendo solo las 15 líneas con mayor y con menor valor para cada característica y así reducir el número de grupos de ligamiento y observar de una manera más sencilla la introgresión del donador en la población.

Tabla 24: Marcadores asociados con características fenotípicas

Característica	Localidad	Marcador	GL
Peso x planta	Palmira (Sequia)	ATA 143	4
Peso x planta	Popayán	BMc176	2
		ATA 143	4

2.7.1.1 Peso por planta en condiciones de sequia en la localidad de Palmira

Se observa que el marcador ATA 143 en el grupo de ligamiento 4 se encuentra asociado a peso por planta en la localidad de Palmira. Se identifica la introgresión del silvestre en una línea con menor peso (104), en contraste, también se presentó introgresión del donante en la posición del marcador ATA 143 en 5 líneas (240, 225, 207, 215, 243) con mayor peso, dándole importancia a este segmento cromosómico para este rasgo (ver figura 36). Hay que tener en cuenta que este QTL, concuerda con los datos obtenidos por marcador simple con un alto porcentaje de variación fenotípica, resultados que certifican la alta confiabilidad de la asociación de este QTL con el peso por planta en condiciones de sequia en la localidad de Palmira.



Figura 36: QTL asociado al rasgo peso por planta en condiciones de sequia en la localidad de Palmira

2.7.1.2 Peso por planta en la localidad de Palmira

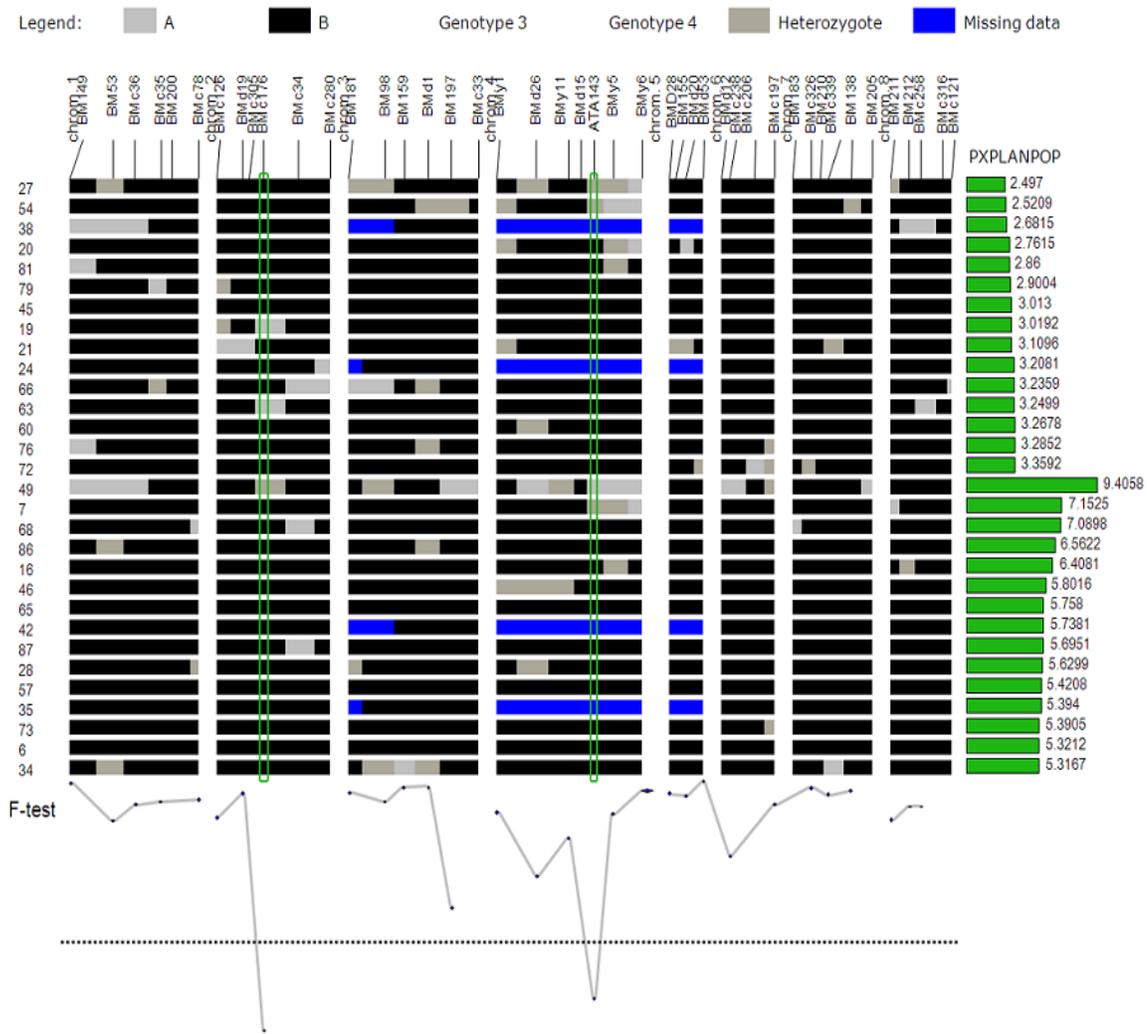


Figura 37: QTL asociado al rasgo peso por planta Popayán

Como se observa en la figura 37, se encontraron 2 marcadores asociados a la característica peso por plante en la localidad de Palmira. El marcador BMc176 en el grupo de ligamiento 2 que está directamente relacionado con los datos obtenidos por intervalo compuesto resaltando así la veracidad de este QTL, y el marcador ATA 143 en el grupo de ligamiento 4. Se presentaron 3 líneas que presentaron introgresión del donante en la posición del marcador BMc176, igualmente se observa que la línea con el mayor peso presenta introgresión del donante en la posición del marcador ATA 143.

2.7.2 Líneas de introgresión

Por medio de CSSL Finder 0.5.3 se seleccionaron las líneas de introgresión con mayor porcentaje del genotipo del padre recurrente, esta selección incluyó un total de 62 líneas de las 276, observándose que no se alcanza a cubrir el genoma de G24390 ya que falta cubrir segmentos en cada uno de los grupos de ligamiento (ver figura 38).

Esta población no se puede considerar como una librería genómica, ya que presenta todavía un porcentaje de heterocigotos alto, que deben ser eliminados llevando la población a generaciones más avanzadas, por otro lado los segmentos del padre donante por fuera de la diagonal también deben ser eliminados por medio de retrocruzas con el padre recurrente y así teniendo en cuenta lo anterior poder estudiar de forma más precisa la influencia del silvestre en el genoma del padre recurrente Radical cerinza.

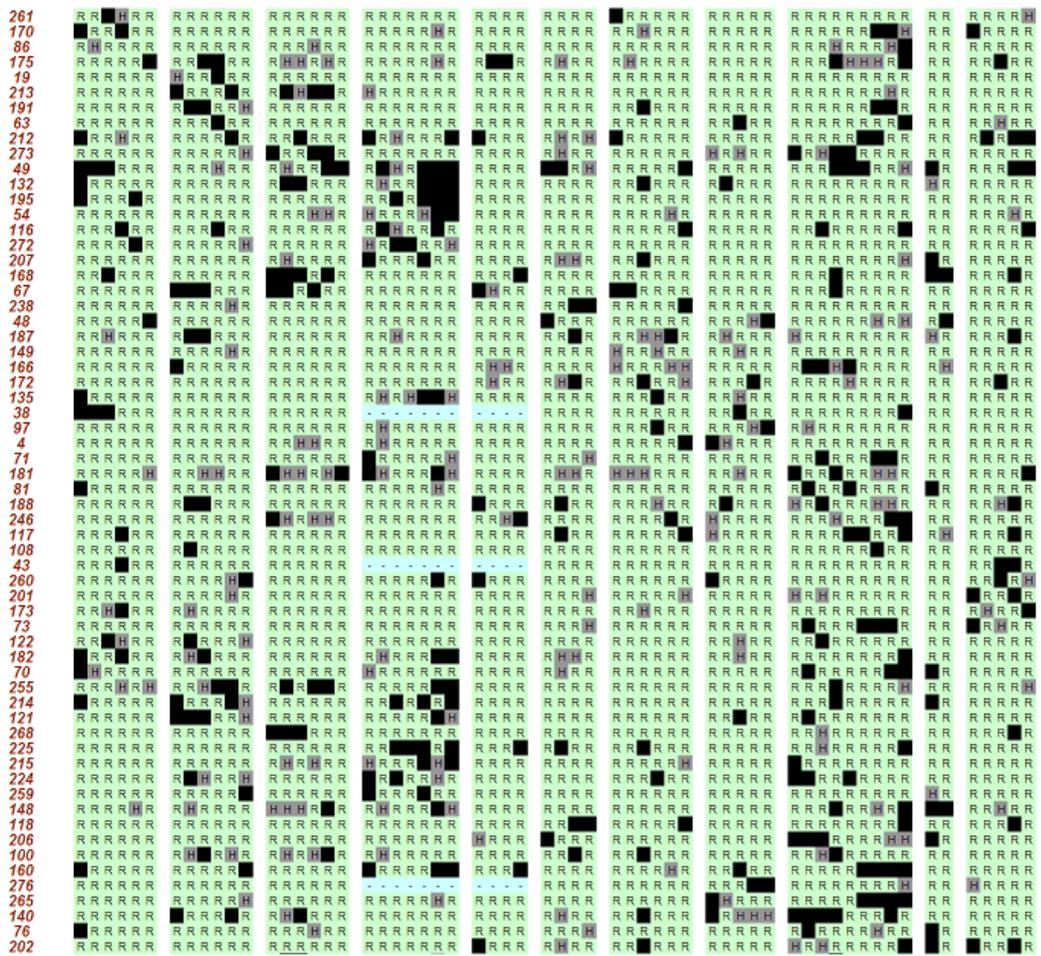


Figura 38: Líneas de segmentos de sustitución cromosómica de la población G24390 X Radical cerinza. Radical cerinza: verde; G24390: Negro; Heterocigoro: Gris; Dato perdido: azul.

7. CONCLUSIONES

- El mapa de ligamiento con un total de 276 individuos tuvo una mayor cobertura y distancias más veraces comparadas con el mapa de ligamiento con 96 individuos.
- El tamaño del mapa utilizado para la identificación de QTLs (92 individuos) tuvo una distancia total de 350.44 cM, en el cual se establecieron los 11 grupos de ligamiento reportados para frijol, con una longitud promedio de 32.60 cM y una distancia promedio entre marcadores de 5.97cM
- Se halló un total de 9 QTLs por medio de análisis por intervalo compuesto, 5 para rendimiento, 3 para peso por planta y 1 para días a madurez todos en la localidad de Popayán.
- El QTL con que mayor variabilidad explicó fue el REND4,1 con un 58% de variabilidad fenotípica para la característica Rendimiento en el grupo de ligamiento 4 debida al cultivar, y el QTL REND 4,2 con una variabilidad del 21% para la misma característica atribuida al silvestre
- Mediante el análisis por marcador simple se obtuvo un total de 57 marcadores asociados a los rasgos fenotípicos, de las cuales un total de 15 marcadores estaban asociados con el rendimiento y 10 de estas fueron atribuida al genotipo silvestre G24390.

- Los QTLs encontrados en Rendimiento Popayán y Peso por planta Popayán están asociados a los mismos marcadores en los mismos cromosomas, lo que verifica la alta correlación existente entre estas dos características en esta localidad
- Se observa introgresión del material silvestre en algunas características de importancia agronómica como en el incremento el peso por planta y por ende el rendimiento, por consiguiente, se puede decir que la mayor parte de alelos silvestre representaron un aporte positivo en la población desarrollada, llevando a la conclusión de la importancia de incluir accesiones silvestres en programas de mejoramiento
- El análisis de líneas de introgresión mostro que existe gran cantidad del genoma del silvestre y de heterocigos que deben ser eliminados, por medio de retrocruzas y avance generación de las poblaciones para así lograr obtener una librería de introgresión en la que se pueda observar de forma más precisa la influencia del silvestre en el genoma del padre recurrente Radical cerinza.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABEBE, A.; BRICK, M.A.; KIRKBY, R.A. 1998. Comparison of selection indices to identify productive dry bean lines under diverse environmental conditions. *Field Crops Res.* 58: 15-23.

ADAM-BLONDON A, SE´ VIGNAC M, DRON M. 1994. A genetic map of common bean to localize specific resistance genes against anthracnose. *Genome* 37: 915-924.

AFANADOR LK, HADLEY SD, 1993. Adoption of a mini-prep DNA extraction method for RAPD marker analysis in common bean. *Bean Improv Coop* 35:10–11

ARIAS, J., JARAMILLO, M.; RENGIFO, T. 2007. Manual: Buenas Prácticas Agrícolas, en la Producción de Fríjol Voluble. MANA, CORPOICA, FAO. Medellin-Antioquia.

BEAVER, J.1993. Should the Caribbean be considered the source of a secondary gene pool for the Andean red beans. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative* 36:30-31.

BECERRA-VELÁSQUEZ, V.L. & P. GEPTS, 1994. RFLP diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Genome* 37: 256-263.

BEEBE, S; OCHOA, I; SKROCH, PW; NIENHUIS, J; TIVANG, J. 1995. Genetic diversity among common bean breeding lines developed for Central America. *Crop Science* 35(4):1178-1183.

BEEBE, S; SKROCH, PW; THOME, J; DUQUE, MC; PEDRAZA, F; NIENHUIS, J. 2000. Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondance analysis of RAPD. *Crop Science* 40(1):264-273.

BLAIR M W, PEDRAZA F, BUENDIA H F, GAITAIN-SOLIS E, BEEBE S E, GEPTS P, TOHME J. 2003. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1362-1374.

BLAIR M W, GIRALDO M C, BUENDÍA H F, TOVAR E, DUQUE M C, BEEBE S E. 2006. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 113: 100-109.

BLAIR, M.W., FREGENE, M.A., BEEBE, S.E., AND CEBALLOS, H. 2007. Marker-assisted selection in common beans and cassava. pp. 81-115.

BLAIR MW, BUENDÍA HF, GIRALDO MC, MÉTAIS I, PELTIER D. 2008.Characterization of AT-rich microsatellites in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.).CIAT, International Center for Tropical Agriculture, 1380 N.W. 78th Ave., Miami, FL, 33126, USA

BLAIR, M. W., L. M. DÍAZ .2009. "Genetic diversity, seed size associations and population structure of a core collection of common beans(*Phaseolus vulgaris* L.)." *Theor Appl Genet* **119**: 955–972.

BONILLA, N.2000. Producción de semilla de frijol posterior al huracán Mitch en Nicaragua. *Agron. Mesoamericana* 11:1-5.

BURR B, BURR FA, THOMPSON KH, ALBERTSON MC AND STUBER CW 1998. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. *Genetics* **118**: 519-526.

CAIXETA, M; ALVES. 2001. Caracterizacao da diversidad e genética em feijao por meio de marcadores RA PD. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, Brasilia 36(2):381-385.

CASAS,J.,RAMIREZ,J.,SANCHEZ,J.,PARRA,J.,HERNANDEZ,S.,CHUELA, M.2003.Characterísticas agronómicas en retrocruzamientos maíz-teocintle.REVISTA FITOTECNIA MEXICANA.Vol.26.Mexico.p.239-248.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL, CIAT. 1986. Morfology of the common bean plant (*Phaseolus vulgaris*).Study guide to be used as a supplement to the audiotutorial unit on the same topic. CIAT. Cali, Colombia, 56 pp.

CENTRO DE INFORMACION TECNOLOGIA, CIT. 2006. Cultivos con potencial de exportación.

CERÓN-ROJAS, J.J. Y J. SAHAGÚN-CASTELLANOS. 2007. Estimating QTL biometrics parameters in F2 populations: a new approach. *Agrociencia* 41:57-73.

CHEN, L. 2006. Anti-microbial chitosan composition for textile products. United States Patent Application, 20060008515.

CHURCHILL, G.A. AND R.W. DOERGE, 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, 138: 963-971.

COHEN, J., GAITAN W. 1984. Potencial use of alien germplasm for maize improvement. *Crop Sci.* 24:1011-1015.

COLLARD B C Y, JAHUFER M Z Z, BROUWER J B, PANG E C K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* **142**: 169–196.

CUBERO, J. 1999. Introducción a la Mejora Genética Vegetal. Editorial Mundi Prensa.

DEBOUCK D. y HIDALGO R. (1985) «Morfología de la planta de frijol común»; en Marcelino López, Fernando Fernández y Aart van Sochoonhoven (comp), *Frijol: investigación y producción* (pp. 7–41). PNUD/CIAT. Cali, Colombia.

DIRECCIÓN GENERAL ADJUNTA DE PLANEACIÓN ESTRATÉGICA Y ANÁLISIS SECTORIAL, 2009. Monografía de frijol.

DOEBLY, J., GOODMAN, M., STUBER, C. 1984. Isoenzymatic variation in *zea* (Gramineae). *Syst. Bot.* 9(2):203-218.

DOERGE, R.W. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. **Nature Reviews Genetics**, v.3, p.43-52.

DURAN, LA; BLAIR, MW; GI RALDO, Z; MA CHIA VELLI, RE ; PROPHETE, E; NIN, JC; BEAVER, JS. 2005. Morphological and molecular characterization of common bean landraces and cultivars from the Caribbean. *Crop Science* 45(4):1320-1328.

EDWARDS, J., ALEN, J., COORS, J. 1996. Teosinte cytoplasm genomes:1. Performance of maize inbreds with teosinte cytoplasm. *Crop Sci.* 36:1088-1091.

EDWARDS, J., COORS, J. 1996. Teosinte cytoplasm genomes:1. Performance of maize hybrids with teosinte cytoplasm. *Crop Sci.* 36:1092-1098.

EMYGDIO, B; ANTUNES, IF; CHOER, E; NEDEL, JL. 2003. Eficiencia de coeficientes de similaridade em genotipos de feijao mediante marcadores RAPD. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. Brasilia 38(2):243-250.

ESTRADA,G., GUILLEN,G., OLIVARES,J., DIAZ,C., ALVARADO,X., SANCHEZ,F. 2008. La transformación genética y genómica del frijol en: Lopez-Munguia,A. Una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología de la UNAM 25 aniversario, cap 25. Mexico, D.F.. UNAM. pags. 281-290

FERREIRA M, GRATTAPAGLIA D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA Brasil. 220p.

FERREIRA A, DA SILVA MF, DA COSTA E SILVA L, CRUZ CD. 2006. Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. *Genet. Mol. Biol.* 29: 182-192.

FIDEICOMISOS INSTITUIDOS RELACIONADOS CON LA AGRICULTURA (FIRA). 2001. El frijol en México, competitividad y oportunidades de desarrollo. Boletín Informativo Núm. 316, Vol. XXXIII. p. 87

FREI A, BLAIR M W, CARDONA C, BEEBE S E, GU H, DORN S. 2005. Identification of quantitative trait loci for resistance to Thrips palmi Karny in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *crop science* **45**: 379-387.

FREYRE R, SKROCH P W, GEFFROY V, ADAM-BLONDON A F, SHIRMOHAMADALI A, JOHNSON W C, LLACA V, NODARI R O, PEREIRA P A, TSAI S M, TOHME J, DRON M, NIENHUIS J, VALLEJOS C E, GEPTS P. 1998. Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. *Theoretical and Applied Genetics* **97**: 847-856.

GAITÁN-SOLÍS E, DUQUE M C, EDWARDS K M, TOHME J. 2002. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-Species amplification in *Phaseolus* spp. *Crop science* **42**: 2128-2136.

GARRIS, A. J.; MCCOUCH, S.R.; KRESOVICH, S. 2003. Population structure and its effect on haplotype diversity and linkage disequilibrium surrounding the xa5 locus of rice (*Oryza sativa* L). *Genetics* **165**: 759-769.

GELDERMANN, H. 1975. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by genes markers. *Theor. Appl. Genet.* **46**:310-330.

GEPTS P. 1988. Phaseolin as an evolutionary marker. En: *Genetics Resources of Phaseolus Beans: their maintenance, domestication, evolution and utilization.* Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 215-241.

GEPTS P, BLISS F A. 1984. Enhanced available methionine concentration associated with higher phaseolin levels in common bean seeds. *Theoretical and Applied Genetics* **69**: 47-53.

GEPTS, P.; BLISS, F. A. 1986. Phaseolin variability among wild and cultivated common Beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. *Econ. Bot.* **40**: 469-478.

GEPTS P, DEBOUCK D G. 1991. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris*, L.). Common beans: research for crop improvement. V. A. Schoonhoven and Voysest, O. Wallingford Common wealth Agricultural Bureaux International. 7–53.

GEPTS, P. 1994. Análisis moleculares del proceso de domesticación en plantas: el ejemplo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). En: Congreso Latinoamericano de Genética (Area Vegetal) y Congreso de Fitogenética. Monterrey (México). 25- 30 Sep 1994. Memorias. Chapingo, México. Sociedad Mexicana de Fitogenética. pp. 3-28.

GEPTS, P., BEAVIS, W.C., BRUMMER, E.C., SHOEMAKER, R.C., STALKER, H.T., WEEDEN, N.F., AND YOUNG, N.D. 2005. Legumes as a model plant family. *Plant Physiology* **137**:1228–1235.

GRISI MCM, BLAIR MW, GEPTS P, BRONDANI C, PEREIRA PAA, BRONDANI RPV. 2007. Genetic mapping of a new set of microsatellite markers in a reference common bean (*Phaseolus vulgaris*) population BAT93 x Jalo EEP558. *Genet Mol Res.*;6:691–706

GUIMARAES, E; RUANE, J; SCHERF, B; SONNINO, A; DARGIE, J. 2007. Marker-assisted selection, current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. Food and Agricultural Organization of the United Nations, FAO. Roma, Italia. 471 p.

HARTL, D. & E. JONES, 2001. Genetics: Analysis of Genes and Genomes, Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA.

HARLAND, J y POP, M.1922. The use and value of backcross in small grain breeding.p.319-322.

HARUSHIMA, Y.; KURATA, N.; YANO, M.; NAGAMURA, Y; SASAKI, T.; MINOBE, Y; ET AL. 1996. Detection of segregation distortions in an indica-japonica rice cross using a high-resolution molecular map. *Theor Appl Genet* **92** (2): 145-150.

HE P, LI JZ, ZHENG XW, SHEN LS, LU CF, CHEN Y AND ZHU LH .2001. Comparison of molecular linkage maps and agronomic trait loci between DH and RIL populations derived from the same rice cross. **Crop Science 41:** 1240-1246.

IICA, COSUDE, RED SICTA, 2007. Mapeo de las cadenas agroalimentarias de maíz blanco y frijol en Centro América. Managua, Nicaragua.

IRIARTE G, 2002. Características agronómicas en una retrocruza avanzada entre una accesión silvestre y una variedad andina mejorada (ICA Cerinza) de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

IZQUIERDO,P. 2010. Identificación de qtl's asociados a la concentración de hierro y zinc en frijol silvestre (*phaseolus vulgaris*)

JANSEN R. 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics Resources of Phaseolus Beans* **135:** 205–211.

JANSEN R, STAM P. 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* **136:** 1447-1455.

JUNG, G.; COYNE, P. W.; SHROCH, J.; NIENHUIS, E.; ARNAUD-SANTANA, J.; BOKOSI, H. M.; ET AL. 1996. Molecular markers associated with plant architecture and resistance to common blight, web blight, and rust in common beans. *J Am Soc Hort Sci* 121 (5): 794-803.

KAPLAN L, L N KAPLAN (1988) *Phaseolus* in Archaeology. In: Genetic Resources of *Phaseolus* Beans. P Gepts (ed). Kluwer Academic Publishers. pp:125-142.

KARP, A.; KRESOVICH, S.; BHAT, K.; AYAD, W.; HODGKIN, T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Roma Italia. 47p.

KARP, A., EDWARDS, K.J. 1998. DNA markers: a global overview», en: *DNA markers: protocols, applications and overviews*. Eds: G. Caetano- Anollés y P.M. Gresshoff, Wiley, Nueva York: 1-13.

KELLY, J., AFANADO, L., HALLEY, S., MIKLAS, P. 1994. Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento de frijol. *Agronomía Mesoamericana*.5:1-7.

KELLY, J. D., SCHNEIDER, K. A., AND KOLKMAN, J. M. 1999. Breeding to improve yield. In: Singh, S.P. (ed.). Developments in plant breeding. Common bean improvement in the twenty-first century. Kluwer Academic Publishers.Dordrecht, Holland.

KELLY, J.D.; KOLKMAN, J.M.; SCHNEIDER, K. 1998. Breeding for yield in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica*, 102: 343-356.

KELLY, J., MELOTTO, M., and STEBAN, E. 2000. Integrando la biotecnología con los métodos clásicos en la mejora de la judía. En: de Ron, Antonio M. y Santalla,M. Actas de mejora genética vegetal. Seminario de mejora genética vegetal. Servicio de publicaciones e intercambio científico. Universidad Santiago de Compostela. España. pp. 13- 34.

KISHA T.J.,SNELLER C.H.,DIERS B.W. 1997. Relationship between genetic distance among parents and genetic variances in populations on soybean. *Crop Sci.*

KREIKE C M, W J STIEKEMA. 1997. Reduced recombination and distorted segregation in a *Solanum tuberosum* (2x) x *S. spegazzinii* (2x) hybrid. *Genome* 40:180-187.

LAMBERS, H., CHAPIN, F.S. III. AND PONS, T.L. 2000. Plant physiological ecology. Springer- Verlag, New York Inc. 539p

LANDER, E.S., P. GREEN, J. ABRAHAMSON, A. BARLOW, M.J. DALY, S.E. LINCOLN & L. NEWBURG, 1987. Mapmaker an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174–181.

LANDER, E. & D. BOTSTEIN, 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185–199.

LANDER, E.S. & L. KRUGLYAK, 1995. Genetic dissection of complex traits: Guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 11: 241–247.

LIAKAT ALI, M.; SÁNCHEZ, P.L.; YU, S.; LORIEUX, M.; EIZENGA, G.C. 2010. Chromosome segment substitution lines: a powerful tool for the Introgression of valuable genes from oryza wild species into cultivated rice (*O. sativa*). *Rice*, 3(4):218-234.

LINCOLN, S., M. DALY & E. LANDER, 1993. Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER/EXP. Version 3.0. Whitehead Institute for Biomedical Research Technical Report, 3rd Edn.

LINDHOUT, P., 2002. The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica* 124: 217–226.

LIU, B.H. 1998. Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis. 611 p. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

MACHADO N., N. B., M. REGINA P., A. B. GATTI, AND V. J. MENDES C. 2006. Temperature effects on seed germination in races of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Sci. Agron.* 28:155–164

MANLY, K.F., H. CUDMORE ROBERT, JR. & J.M. MEER, 2001. Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mamm Genome* 12: 930–932.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, P., R. SÁNCHEZ-PÉREZ, M. RUBIO, F. DICENTA, T.M. GRADZIEL Y G.O. SOZZI. 2005. Application of recent biotechnologies to Prunus tree crop genetic improvement. *Cien. Inv. Agr.* 32:73-96.

MASUELLI R W, E Y TANIMOTO, C R BROWN, L COMAI .1995. Irregular meiosis in a somatic hybrid between *S. bulbocastanum* and *S. tuberosum* detected by species-specific PCR markers and cytological analysis. *Theor. Appl. Genet.* 91:401-408.

MIRANDA, S; ROSAS, JC; ARANDA, LL; ORTÍZ, R; PONCE, M; RÍOS, H. 2006, Análisis molecular de la diversidad genética de frijol común manejada por campesinos de Cuba. *Agronomía Mesoamericana* 17(3):369-382.

MOHAN M, NAIR S, BHAGWAT A, KRISHNA TG, YANO M .1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Mol. Breed.* 3: 87-103.

MORALES, FJ; ARAYA, CM; HERNÁNDEZ, JC; ARROYAVE, JA; CUERVO, M; VELASCO, AC; CASTAÑO, M. 1999. Etiología del Amachamiento del frijol común en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas* 52:42-48.

MUÑOZ-PEREA, C. G., R. G. ALLEN (2006). "Water use efficiency among dry bean landraces and cultivars in drought-stressed and non-stressed environments." *Euphytica* **155**: 393–402.

NACAGAHRA, M. 1972. Genetic mechanism on the distorted segregation of markers gene belonging to the eleventh linkage group in cultivated rice. *J Breed.* 22: 232-238.

NYBOM H, G D ESSELINK, G WERLEMARK, B VOSMAN. 2004. Microsatellite DNA marker inheritance indicates preferential pairing between two highly homologous genomes in polyploidy and hemisexual dog-roses, *Rosa L. Sect. Caninae* DC. *Heredity* 92:139-150.

NODARI R, TSAI S M, GUZMAN P, GILBERTSONT R L, GEPTS P. 1992. Toward an Integrated Linkage Map of Common Bean. III. Mapping Genetic Factors Controlling Host-Bacteria Interactions. *Genetics* **134**: 341-350.

ORTIZ, V. (1998). «El frijol en el estado de Zacatecas», Gobierno del Estado de Zacatecas, Zacatecas, 181 p

PATERSON, A. 1996. Genome mapping in plants. Academic Press. California, USA. 330 p.

PAZ M, TANIA, SELMIRA F, GUY D. 2007. Informe de cadena de frijol rojo en Nicaragua. NITLAPAN. International Food Policy Research Institute, Managua.

PEREZ, J. 2009. Evaluación de genotipos de frijol andino de la colección referencia del CIAT bajo condiciones de sequía

PHILLIPS, W; FRITZ, P. 1995. Cacao y marcadores de ADN en el CATIE. Mejoramiento genético y desarrollo de los cultivos tropicales. Turrialba, CR, CATIE. p 25.

PILET-NAYEL, M.L., F.J. MUEHLBAUER, R.J. MCGEE, J.M. KRAFT, A. BARANGER & C.J. COYNE, 2002. Quantitative trait loci for partial resistance to *Aphanomyces* root rot in pea. *Theor Appl Genet* 106: 28–39.

PLUCKNET, D., NIGEL, N., WILLIAMS, J., ANISHETTY, N. 1992. Los bancos genéticos y la alimentación mundial. Traducido por CIAT. San José, Costa Rica. Instituto de Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA); Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 260 p.

QUILLET M C, N MADJIDIAN, Y GRIVEAU, H SERIEYS, M TERSAC, M LORIEUX, A BERVILLÉ (1995) Mapping genetic factors controlling pollen viability in an interspecific cross in *Helianthus* sect. *Helianthus*. *Theor. Appl. Genet.* 91:1195-1202.

RISCH N .1992. Genetic linkage: Interpreting LOD scores. *Science* 255: 803–804

ROMERO, P.E. 1993. «El frijol y la alimentación»; en Cuauhtémoc González Pacheco y Felipe Torres Torres (Coord), *Los retos de la soberanía alimentaria en México* (pp. 53–67), Tomo I, Instituto de Investigaciones Económicas, UNAM–Juan Pablos, México *hysiol.*, 137

SAX, K. 1923. The association of size differentials with seed coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics*. 8:552-560.

SAYED, H., H. KAYYAL, L. RAMSEY, S. CECCARELLI & M. BAUM, 2002. Segregation distortion in doubled haploid lines of barley (*Hordeum vulgare* L.) detected by simple sequence repeat markers. *Euphytica* 225: 265–272.

SEMAGN K, BJØRNSTAD Å, SKINNES H, MARØY AG, TARKEGNE T, WILLIAM M. 2006. Distribution of DArT, AFLP, and SSR markers in a genetic linkage map of a doubled-haploid hexaploid wheat population. *Genome* 49: 545–555.

SINGH S P, GEPTS P, DEBOUCK D G. 1991. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economical Botany* 45: 379–396.

SINGH, S.P.; MOLINA, A.; URREA, C.A.; GUTIÉRREZ, J.A. 1993. Use of interracial hybridization in breeding the race Durango common bean. *Can. J. Plant Sci.*, 73: 785-793.

SINGH, A., 1995. Influence of UV-B radiation on tropical legumes. *Trop.Ecol.*, 36: 249–52

SINGH,S.P. 1999. Integrated genetic improvement. *In:* S. P. Singh (ED). Common Bean Improvement in the Twenty-first Century. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands. pp: 133-165.

SCHOONHOVEN, A. VAN Y CARDONA, C. 1985. Plagas que atacan el follaje. *In:* López, M.; Fernández, F y Schoonhoven, A. van (Eds.). Frijol: Investigación y producción. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. p. 263–274.

SKROCH, P; NIENHUIS, J; BEEBE, S; TOHME, J; PEDRAZA, F. 1998. Comparison of Mexican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) core and reserve germplasm collection. *Crop Science* 38(2):488-496.

TANKSLEY, S. 1993. Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics* 27:205-233.

TAR'AN B, MICHAELS T E, PAULS K P. 2002. Genetic Mapping of Agronomic Traits in Common Bean. *Crop Science* 42: 544-556.

TERÁN, H. & SINGH, S. P. 2002 Comparisons of Sources and lines selected for drought resistances in common bean. *Crop Sci.* 42:64-70.

VALADEZ, E.; G. KAHL .2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. Mundiprensa- Aedos, Barcelona.

VALLEJO, F y ESTRADA, E. 2002. Mejoramiento genético de plantas. Universidad Nacional de Colombia. Palmira.

VERA, CM ; PAREDES, MC ; BECERRA, VV. 1999. Estudio comparativo de diversidad morfológica, isoenzimática y RAPDs dentro y entre clases comerciales de frijol chileno (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agricultura Técnica* 59(4):247-259

VODENICHAROVA, M.S. 1989. Use of proteins as molecular genetic markers in plants. *Genetics Selection* 22:269–277.

VOYSEST, O., VALENCIA, M., AMEZQUITA, M. 1994 .Genetic diversity among Latino America Andean and Mesoamerican Common bean cultivars. *Crop sci.*34:1100-1110.

VOYSEST, O. 2000. Mejoramiento genético de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Legado de variedades de América Latina 1930 – 1999. Centro internacional de agricultura tropical, Cali, Colombia.

YAN X, LIAO H, BEEBE S, BLAIR M, J L. 2004. QTL mapping of root hair and acid exudation traits and their relationship to phosphorus uptake in common bean. *Plant and Soil* **265**: 17-29.

YOUNG, N.D., 1994. Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers, p. 39–57, In: I. K.V. Ronald & L. Phillips (Eds.), DNA-based markers in plants. Kluwer, Dordrecht/ Boston/London.

YOUNG N.D. 1996. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 479-501.

YU K, PARK S J, POYSA V, GEPTS P. 2000. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Heredity* **91**: 429- 434.

WORTMAN C, KIRKBY R, ELEDU C AND ALLEN D 1998. Atlas of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) production in Africa. CIAT, Cali, Columbia.

XU, Y., L. ZHU, J. XIAO, N. HUANG & S.R. MCCOUCH, 1997. Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F2, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Genet* 253: 535–545.

ZENG, Z.-B., 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136: 1457–1468.

ZENG, Z.-B., 1993. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10972–10976.

9. ANEXOS

ANEXO A: Germinación de semillas

- Escarificar 10 semillas que se encuentren en óptimas condiciones, sembrarlas en toallas de papel colocando el hipocotilo mirando hacia abajo.
- Preparar sulfato de calcio a una concentración de 0.5 Mm y depositar en una bandeja
- Poner en la bandeja los rollos de papel de germinación con la semilla y colocar en la oscuridad de 4 a 6 días
- Cosechar en tubos de cola para su posterior maceración

ANEXO B: Método mini prep para extracción de ADN de frijol.

- A cada eppendorf con tejido vegetal se le agregan 100 ul de buffer de extracción para macerar.
- Una vez macerado se agregan 750 ul de buffer de extracción.
- Incubar durante una hora a 65°C.
- Adicionar 850 ul de cloroformo:octanol (24:1) y agitar durante 30 minutos.
- Centrifugar 10 minutos a 12000 r.p.m.
- Tomar 750 ul de sobrenadante en otro eppendorf.
- Agregar al sobrenadante 500 ul de isopropanol a –20°C (2/3 del volumen) y 75 ul de acetato de sodio a –20°C (1/10 del volumen).
- Dejar a – 20°C.
- Centrifugar 10 minutos a 12000 r.p.m. y descartar el sobrenadante.
- Lavar el pelet con 500 ul de etanol al 70%.
- Descartar el etanol y dejar que el pelet se seque.
- Resuspender el pelet en 150 ul de agua con RNAsa. Se debe tener en cuenta que se agregar 6 ul de RNAsa por ml de agua.
- Incubar a 37°C una hora

ANEXO C: Pasos para la tinción con plata.

- Colocar el gel en solución fijadora 20 minutos.
- Hacer dos lavados de 3 minutos con agua deionizada.
- Colocar el gel en la solución de tinción por 30 minutos.
- Lave rápidamente el gel con agua deionizada.
- Coloque el gel en la solución reveladora hasta que empiece a visualizar las bandas. Recuerde que esta solución debe estar a 10°C.
- Una vez visualice las bandas coloque el gel en la solución de parada durante cinco minutos.
- Lave durante 5 minutos con agua deionizada.
- Deje secar.

ANEXO D: Microsatélites evaluados en parentales de interés agronómico

MICROSATELITE	ORIGEN	POLIMORFICO POBLACION RXG
ATA10	GENOMICO	
ATA108	GENOMICO	X
ATA112	GENOMICO	
ATA113	GENOMICO	
ATA116	GENOMICO	
ATA119	GENOMICO	
ATA121	GENOMICO	
ATA122	GENOMICO	
ATA13	GENOMICO	
ATA133	GENOMICO	
ATA138	GENOMICO	X
ATA143	GENOMICO	X
ATA145	GENOMICO	X
ATA150	GENOMICO	
ATA16	GENOMICO	
ATA165	GENOMICO	
ATA170	GENOMICO	
ATA172	GENOMICO	X
ATA173	GENOMICO	
ATA175	GENOMICO	
ATA180	GENOMICO	
ATA2	GENOMICO	
ATA20	GENOMICO	
ATA209	GENOMICO	
ATA220	GENOMICO	X
ATA2234	GENOMICO	X
ATA226	GENOMICO	
ATA234	GENOMICO	
ATA236	GENOMICO	
ATA24	GENOMICO	
ATA241	GENOMICO	
ATA243	GENOMICO	
ATA244	GENOMICO	
ATA247	GENOMICO	X
ATA248	GENOMICO	

ATA26	GENOMICO	X
ATA269	GENOMICO	X
ATA27	GENOMICO	
ATA271	GENOMICO	
ATA288	GENOMICO	
ATA289	GENOMICO	X
ATA296	GENOMICO	X
ATA30	GENOMICO	X
ATA32	GENOMICO	
ATA4	GENOMICO	
ATA5	GENOMICO	X
ATA6	GENOMICO	
ATA69	GENOMICO	
ATA7	GENOMICO	
ATA71	GENOMICO	
ATA74	GENOMICO	X
ATA76	GENOMICO	X
ATA77	GENOMICO	
ATA84	GENOMICO	
ATA86	GENOMICO	X
ATA9	GENOMICO	X
ATA90	GENOMICO	
ATABN	GENOMICO	
ATACA3	GENOMICO	
ATACA5	GENOMICO	
ATACAC1	GENOMICO	
ATACAC2	GENOMICO	
ATAGA11	GENOMICO	
ATAGA12	GENOMICO	
ATAGA15	GENOMICO	
ATAGA16	GENOMICO	X
ATAGA4	GENOMICO	
ATAGA9	GENOMICO	
ATAHRG	GENOMICO	
ATAME1	GENOMICO	X
ATAPG2	GENOMICO	
BM114	GENOMICO	
BM137	GENOMICO	
BM138	GENOMICO	X
BM140	GENOMICO	
BM141	GENOMICO	
BM142	GENOMICO	
BM142	GENICO	

BM143	GENOMICO	
BM148	GENOMICO	X
BM149	GENOMICO	X
BM154	GENOMICO	X
BM155	GENOMICO	X
BM156	GENOMICO	X
BM157	GENOMICO	
BM158	GENOMICO	
BM159	GENOMICO	X
BM161	GENOMICO	
BM164	GENOMICO	
BM166	GENOMICO	
BM167	GENOMICO	
BM170	GENOMICO	
BM171	GENOMICO	
BM172	GENOMICO	
BM175	GENOMICO	
BM181	GENOMICO	X
BM183	GENOMICO	X
BM184	GENOMICO	X
BM185	GENOMICO	
BM187	GENOMICO	
BM188	GENOMICO	X
BM189	GENOMICO	
BM195	GENOMICO	
BM197	GENOMICO	X
BM199	GENOMICO	
BM200	GENOMICO	X
BM201	GENOMICO	
BM205	GENOMICO	X
BM209	GENOMICO	X
BM210	GENOMICO	X
BM211	GENOMICO	X
BM212	GENOMICO	X
BM213	GENOMICO	
BM25	GENOMICO	
BM377A	GENOMICO	
BM377B	GENOMICO	X
BM379	GENOMICO	
BM382	GENOMICO	
BM397	GENOMICO	X
BM398	GENOMICO	
BM399	GENOMICO	

BM403	GENOMICO	
BM404	GENOMICO	
BM405	GENOMICO	
BM411	GENOMICO	
BM448	GENOMICO	
BM449	GENOMICO	
BM453	GENOMICO	
BM53	GENOMICO	X
BM98	GENOMICO	X
BMC103	GENICO	
BMC104	GENICO	
BMC108	GENICO	X
BMC109	GENICO	
BMC112	GENICO	
BMC113	GENICO	
BMC114	GENICO	
BMC115	GENICO	
BMC116	GENICO	
BMC121	GENICO	X
BMC122	GENICO	
BMC123	GENICO	
BMC125	GENICO	
BMC126	GENICO	X
BMC128	GENICO	
BMC129	GENICO	
BMC131	GENICO	
BMC132	GENICO	
BMC140	GENICO	X
BMC147	GENICO	
BMC150	GENICO	X
BMC151	GENICO	
BMC159	GENICO	
BMC159	GENICO	
BMC161	GENICO	
BMC165	GENICO	X
BMC168	GENICO	X
BMC168	GENICO	X
BMC17	GENICO	
BMC171	GENICO	X
BMC175	GENICO	
BMC176	GENICO	X
BMC178	GENICO	
BMC18	GENICO	

BMC180	GENICO	
BMC181	GENICO	
BMC183	GENICO	
BMC184	GENICO	X
BMC185	GENICO	
BMC186	GENICO	
BMC187	GENICO	
BMC190	GENICO	
BMC197	GENICO	X
BMC198	GENICO	
BMC201	GENICO	X
BMC201	GENICO	X
BMC202	GENICO	X
BMC206	GENICO	X
BMC216	GENICO	X
BMC217	GENICO	X
BMC220	GENICO	
BMC221	GENICO	
BMC222	GENICO	
BMC224	GENICO	
BMC225	GENICO	
BMC226	GENICO	
BMC226	GENICO	
BMC228	GENICO	
BMC229	GENICO	
BMC23	GENICO	
BMC230	GENICO	
BMC231	GENICO	
BMC232	GENICO	
BMC234	GENICO	X
BMC237	GENICO	
BMC238	GENICO	X
BMC24	GENICO	
BMC240	GENICO	X
BMC241	GENICO	X
BMC242	GENICO	
BMC243	GENICO	
BMC245	GENICO	
BMC248	GENICO	
BMC249	GENICO	
BMC25	GENICO	X
BMC254	GENICO	X
BMC258	GENICO	X

BMC26	GENICO	
BMC269	GENICO	X
BMC280	GENICO	X
BMC283	GENICO	X
BMC284	GENICO	X
BMC285	GENICO	X
BMC288	GENICO	X
BMC294	GENICO	
BMC299	GENICO	X
BMC305	GENICO	X
BMC307	GENICO	X
BMC309	GENICO	X
BMC316	GENICO	X
BMC32	GENICO	
BMC320	GENICO	X
BMC322	GENICO	X
BMC326	GENICO	X
BMC327	GENICO	X
BMC33	GENICO	
BMC333	GENICO	X
BMC338	GENICO	X
BMC339	GENICO	
BMC34	GENICO	X
BMC35	GENICO	X
BMC342	GENICO	X
BMC345	GENICO	X
BMC346	GENICO	X
BMC347	GENICO	X
BMC350	GENICO	
BMC351	GENICO	X
BMC352	GENICO	X
BMC355	GENICO	
BMC356	GENICO	
BMC36	GENICO	X
BMC362	GENICO	
BMC367	GENICO	X
BMC370	GENICO	
BMC371	GENICO	
BMC63	GENICO	X
BMC64	GENICO	
BMC65	GENICO	
BMC66	GENICO	
BMC68	GENICO	

BMC69	GENICO	X
BMC70	GENICO	X
BMC72	GENICO	
BMC73	GENICO	X
BMC77	GENICO	
BMC78	GENICO	X
BMC79	GENICO	X
BMC88	GENICO	
BMC89	GENICO	
BMC90	GENICO	
BMC91	GENICO	
BMC92	GENICO	
BMC94	GENICO	X
BMC95	GENICO	
BMC97	GENICO	X
BMC98	GENICO	
BMD1	GENICO	X
BMD11	GENOMICO	
BMD12	GENOMICO	X
BMD15	GENICO	X
BMD19	GENICO	X
BMD20	GENICO	X
BMD21	GENICO	
BMD22	GENICO	X
BMD26	GENICO	X
BMD28	GENICO	X
BMD32	GENICO	X
BMD46	GENICO	X
BMD53	GENICO	X
GATS11	GENOMICO	X
BMV1	GENICO	X
BMV5	GENICO	X
BMV6	GENICO	X
BMV11	GENICO	X