



**DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA COLECCIÓN NÚCLEO DE SILVESTRES DE
FRÍJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.) ANALIZADOS MEDIANTE
MICROSATÉLITES FLUORESCENTES**

ÁLVARO SOLER GARZÓN

**UNIVERSIDAD TOLIMA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
IBAGUÉ-TOLIMA
2009**

**DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA COLECCIÓN NÚCLEO DE SILVESTRES DE
FRÍJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.) ANALIZADOS MEDIANTE
MICROSATÉLITES FLUORESCENTES**

ÁLVARO SOLER GARZÓN

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

MATTHEW BLAIR Ph.D.

Director

GUSTAVO ADOLFO VALLEJO Ph.D.

Codirector

**UNIVERSIDAD TOLIMA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
IBAGUÉ-TOLIMA
2009**

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 de las ideas expuestas por el autor del presente trabajo.

Artículo 16, Acuerdo 032 de 1976 y Artículo 29, acuerdo 064 de 1991, Consejo Académico de la Universidad del Tolima.

NOTA DE ACEPTACIÓN

El trabajo de grado titulado “**DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA COLECCIÓN NÚCLEO DE SILVESTRES DE FRÍJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.) ANALIZADOS MEDIANTE MICROSATÉLITES FLUORESCENTES**”, presentado por el estudiante ÁLVARO SOLER GARZÓN, para optar al título de Biólogo, fue revisado y calificado como:

Aprobado

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

Gustavo Adolfo Vallejo Ph. D
LIPT-Universidad del Tolima

Firma de jurado

Firma de jurado

Ibagué, Marzo de 2009

DEDICATORIA

A mis padres por todos sus cuidados y esfuerzos para que no me faltara nada y a mis hermanas por todo su apoyo durante los momentos más importantes de mi vida.

A Ketty Ordoñez por acompañarme y ofrecerme su cariño, dándome muchas alegrías en los momentos en que más lo necesitaba, siendo un aliento para continuar.

A todas la personas que me han respaldado y han creído en mí.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

Dr. Matthew W. Blair, director de mi trabajo de grado, por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo y apoyarme durante este proceso.

Dr. Gustavo A. Vallejo, Codirector de mi trabajo de grado, por ser una inspiración y un modelo a seguir en mi vida profesional.

Msc. Lucy Milena Díaz e Ing. Héctor F. Buendía, mis tutores, por sus buenos consejos y apoyo incondicional, siendo un aliento para no desistir.

Mis amigos del LCGF, Natalia Hurtado, Aura Díaz, Alejandra, Marcela Franco, Lorena Herrera, Marina Villacis, Juan Carlos Pérez, Víctor Mayor, Freddy Monserrate, Paulo Izquierdo y Deissy Juyo, por tantos momentos de tranquilidad y felicidad, y su compañía en los momentos de dificultad.

Mis compañeros del Laboratorio de Caracterización del Germoplasma del Frijol, por su colaboración y guía en el transcurso del desarrollo de este trabajo.

Mis compañeros del Patio de Frijol, por su colaboración y paciencia.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	15
1. MARCO TEÓRICO	17
1.1. GENERALIDADES DEL FRÍJOL.....	17
1.2. CITOLOGÍA.....	19
1.3. IMPORTANCIA DEL CULTIVO.....	19
1.3.1. Producción y consumo.....	19
1.3.2. Valor Nutritivo.....	20
1.3.3. Factores antinutricionales.....	20
1.3.4. Problemas de Producción.....	20
1.4. ORIGEN, DISTRIBUCIÓN Y DOMESTICACIÓN.....	22
1.5. IMPORTANCIA DE ESTABLECER UNA COLECCIÓN NÚCLEO DE GERMOPLASMA.....	25
1.6. VALOR DEL GERMOPLASMA SILVESTRE.....	25
1.7. MARCADORES GENÉTICOS.....	26
1.7.1. Marcadores morfológicos o morfoagronómicos.....	27
1.7.2. Marcadores bioquímicos: Caso Faseolina.....	27
1.7.3. Marcadores moleculares.....	28
1.7.3.1. Microsatélites.....	28
1.7.3.2. AFLP (Amplified fragment length polymorphism).....	30
1.8. ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN FRÍJOL COMÚN SILVESTRE.....	31

2.	OBJETIVO.....	35
2.1.	OBJETIVO GENERAL.....	35
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
3.1.	UBICACIÓN.....	36
3.2.	POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	36
3.2.1.	Germinación de semilla.....	37
3.2.2.	Procesamiento del material vegetal.....	38
3.2.3.	Extracción y cuantificación de ADN.....	38
3.2.4.	Amplificación de microsatélites por PCR.....	39
3.2.5.	Control de calidad de la amplificación.....	40
3.2.6.	Agrupación de las muestras.....	41
3.2.7.	Detección y estimación de alelos.....	42
3.3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	42
3.3.1.	Matriz de distancias genéticas.....	42
3.3.2.	Análisis de la estructura de población.....	42
3.3.3.	Análisis de diversidad genética.....	43
3.3.4.	Análisis molecular de varianza.....	43
3.4.	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES.....	44
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
4.1.	DIVERSIDAD ALÉLICA.....	46

4.1.1. Polimorfismo alélico.....	46
4.2. ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO.....	49
4.3. ESTRUCTURA GENÉTICA.....	52
4.4. ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES (PCoA).....	56
4.5. IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS GENERADOS EN STRUCTURE.....	57
4.6. DIVERSIDAD ALÉLICAS DE LOS GRUPOS GENERADOS.....	63
4.7. ANÁLISIS MOLECULAR DE VARIANZA.....	65
4.8. COMPARACIÓN SSRs CONTRA AFLP.....	65
5. CONCLUSIONES.....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	68
ANEXOS.....	77

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Problemas de producción del cultivo de frijol común, incidencia y porcentaje de pérdida en rendimiento.....	21
Tabla 2. Acervo, raza, faseolina y haplotipo de ADNcp características de cada raza domesticada de <i>Phaseolus vulgaris</i>	23
Tabla 3. Algunos rasgos de interés de silvestres de <i>P. vulgaris</i>	26
Tabla 4. Comparación entre algunos sistemas de marcadores moleculares.....	28
Tabla 5. Set de tintes estándar Applied Biosystems para aplicaciones de genotipaje.....	30
Tabla 6. Estudios de Diversidad genética realizados en silvestres de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	32
Tabla 7. País de origen y controles utilizados en el estudio de diversidad de las accesiones silvestres de <i>Phaseolus vulgaris</i>	37
Tabla 8. Cebadores fluorescentes evaluados.....	39
Tabla 9. Esquema del análisis molecular de varianza.	44
Tabla 10. Diversidad genética de 104 accesiones silvestres y cuatro controles de diversidad, analizada con 36 marcadores fluorescentes (19 genómicos y 17 génicos).....	47
Tabla 11. Diversidad genética de la colección referencia de silvestres de frijol común.....	64
Tabla 12. Resultados del análisis molecular de varianza (AMOVA), comparando las Poblaciones derivadas del análisis con el programa STRUCTURE.....	65
Tabla 13. Comparación de grupos generados a partir de análisis con SSR vs. AFLP (Thome et al., 1996) en la colección con de silvestres de <i>Phaseolus vulgaris</i>	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hábitos de crecimiento de la planta de frijol.....	18
Figura 2. Controles de diversidad por acervo genético.....	36
Figura 3. Colección de accesiones silvestres germinadas en casa de malla.....	37
Figura 4. Máquina liofilizadora con muestras en el interior.....	38
Figura 5. Maceración de la muestra secada en liofilizador.....	38
Figura 6. Control de amplificación de algunos marcadores microsatélites fluorescentes realizado en Agarosa al 1%.....	40
Figura 7. Diagrama del procedimiento que sigue la muestra a analizar.....	41
Figura 8. Relación entre Contenido de información polimórfica (PIC) de cada microsatélite y el número de bandas alélicas identificadas por 19 microsatélites genómicos y 17 génicos.....	49
Figura 9. Dendrograma de similaridad genética en accesiones de la colección núcleo de <i>P. vulgaris</i> silvestres, dibujado por UPGMA mediante el estimado de Nei-Li (DICE) basados en marcadores microsatélites fluorescentes. En líneas de color negro accesiones que no formaron grupo.....	50
Figura 10. Evolución del valor del 'log-likelihood' (LnP D) en función del número K de poblaciones (promedio de 25 repeticiones del análisis para cada valor de K)..	52
Figura 11. Gráfica de estructura de la población (K=2 a K=5) para 104 accesiones silvestres y 4 cultivadas. Nombres de grupos/clúster indicados bajo la figura.....	53
Figura 12. Dendrograma de agrupamiento por estructura de población generados a partir del programa STRUCTURE usando el método UPGMA mediante el estimado de Nei -Li (DICE) basados en marcadores microsatélites.	55
Figura 13. Representación grafica en dos dimensiones de la distribución y ubicación espacial de los genotipos silvestres a partir el Análisis de coordenadas Principales (PCoA). Colores de acuerdo a agrupamientos generados por STRUCTURE.....	57
Figura 14 . Semilla de accesiones pertenecientes al Acervo Mesoamericano....	58
Figura 15. Semilla de accesiones pertenecientes al centro menor Guatemala...	59

Figura 16. Semilla de accesiones pertenecientes al centro menor Colombia.....	59
Figura 17. Semilla de accesiones pertenecientes al Centro menor Ecuador-Norte del Perú.....	60
Figura 18. Semilla de accesiones pertenecientes al Acervo Andino.....	60
Figura 19. Representación de países de origen por cada grupo poblacional encontrado basado en STRUCTURE.....	61
Figura 20. Distribución de patrón de faseolina dentro de cada grupo poblacional basado en STRUCTURE.....	62
Figura 21. Distribución del haplotipo de cloroplasto dentro de cada grupo poblacional basado en STRUCTURE.....	62

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Protocolo de Extracción, Kit Viogene PGP1002.....	78
Anexo B. Organización en paneles de los marcadores microsatélite marcados fluorescentemente, teniendo en cuenta la secuencia, rango alélico y el motivo de cada uno.....	79
Anexo C. Datos de pasaporte de las accesiones de la Colección Núcleo de Silvestres y 4 Cultivares de <i>Phaseolus vulgaris</i>	80
Anexo D. Dendrogramas de agrupamiento por características de País de Origen, Haplotipo de Cloroplasto y Faseolina.....	83
Anexo E. Análisis de diversidad genética por marcador microsatélite genómico y génico.....	86

RESUMEN

Las colecciones núcleo desarrollan un papel importante en la utilización de los recursos genéticos, ya que poseen el material prioritario para la mejora. El desarrollo y la aplicación de SSRs facilitan la adquisición de una gran cantidad de información genética para la caracterización de colecciones de germoplasma. El objetivo de este estudio fue Caracterizar la diversidad genética de 104 accesiones silvestres de la Colección Núcleo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) procedentes de la Unidad de Recursos Genéticos del CIAT (URG-CIAT), mediante el uso de 36 marcadores moleculares tipo microsatélites analizados con una técnica de fluorescencia. Se identificaron un total de 492 alelos con un promedio de 13.30 alelos por marcador, y un promedio de Contenido de Información Polimórfica de 0.64. Usando los programas NTSyS y STRUCTURE, se identificaron cinco grupos bien definidos correspondiendo a los dos principales acervos: Mesoamérica y Andino, y los centros menores de Colombia, Ecuador-Norte del Perú y Guatemala. Accesiones provenientes de Guatemala y el sur de México presentaron diferenciación genética y estructural con los otros acervos y centros menores. Se presenta una alta diversidad genética en el acervo Mesoamérica que en el Andino, presentándose en este último asociaciones discretas en ciertas regiones, posiblemente reflejando el aislamiento geográfico y genético. Un alto valor de F_{ST} confirmó la congruente separación de los grupos en cuanto a su estructura genética.

Palabras Clave: SSRs, Fluorescencia, Diversidad Genética, Colección Núcleo de Silvestres, *Phaseolus vulgaris* L.

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una planta diploide con un genoma pequeño y se encuentra estrechamente relacionada con otras especies cultivables del género *Phaseolus*. Además, es una de las leguminosas más importante del mundo para el consumo humano debido a su valor nutricional, aportando proteínas, fibra dietética, minerales y vitaminas (Broughton et al., 2003).

El frijol común tiene su origen en América, y diversos estudios con marcadores morfoagronómicos, bioquímicos y moleculares ubican dos áreas principales de domesticación a partir de poblaciones silvestres: (Mesoamérica y los Andes Suramericanos), las cuales han originado por barreras parciales de aislamiento reproductivo (Gepts, 1985). El entendimiento de la diversidad del frijol facilitará su uso en mejoramiento genético de este cultivo (Tohme et al., 1996, Beebe et al., 2000).

En Colombia, se ha observado una gran diversidad de germoplasma, reportándose cultivares de frijol de ambos acervos, posiblemente debido a su ubicación territorial con América Central y su cercanía a la terminación de la cordillera de los Andes (Blair et al., 2007). Thome et al. (1996), observaron en la estructura de la población colombiana un considerable entrecruzamiento e intercambio genético, reflejando eventos de introgresión aleatoria de frijoles silvestres locales con frijoles de otros grupos.

En programas de mejoramiento genético es fundamental disponer de fuentes de variabilidad heredable de valor presente o potencial para los rasgos que se pretendan mejorar. Especialmente, esta variabilidad se puede encontrar en individuos de la misma especie, y en especies y/o géneros relacionados, silvestres y/o cultivados.

Los parientes silvestres de los cultivares son fuentes de genes de interés, entre ellos tenemos los responsables para la adaptación a diferentes condiciones climáticas, resistencia a factores de estrés, como la sequía y la salinidad, y la resistencia a enfermedades (Acosta-Gallegos et al., 2007).

La colección de frijol común del CIAT consta de más de 30.000 accesiones entre líneas domesticadas y silvestres, de las cuales 1.822 accesiones son silvestres (URG-CIAT, 2009). Por lo tanto, se ha determinado una colección núcleo de 104 accesiones de frijol común silvestre que representan la variabilidad de todos los genotipos silvestres en cuanto a criterios de rango de distribución, morfología, fisiología, y marcadores AFLP (de sus siglas en inglés, *Amplified fragment length polymorphism*). Es decir, esta colección núcleo no posee duplicados, por lo que se minimiza la similaridad entre accesiones, siendo diferentes tanto genética como ecológicamente.

En estudios de análisis de diversidad genética las tecnologías de marcadores moleculares ofrecen un gran soporte para la implementación de alternativas complementarias que logren obtener resultados que aporten al mejoramiento de las características de una especie (De Vicente, 2002). Por lo anterior, los microsatélites son una herramienta simple que tiene numerosas ventajas para los análisis moleculares, como alto poder de discriminación, alto nivel de información por su naturaleza multialélica, herencia codominante, fácilmente reproducible y robusto, abundancia y amplia cobertura en el genoma, transferible entre poblaciones, y fácil detección con sistemas automatizados (Buso et al., 2006, Collard et al., 2005, Masi et al., 2003).

En análisis con marcadores tipo microsatélite se obtienen una gran ventaja al revelar un gran número de bandas polimórficas. Los valores de heterocigosidad encontrados para los microsatélites son mucho mas altos en comparación con las isoenzimas y los RFLP (de sus siglas en Ingles, *Restriction Fragment Length Polymorphism*), que por lo general es común encontrar solo entre 2 a 4 alelos mientras que con microsatélites pueden revelar entre 2 a 25 alelos, demostrando así su alto grado de polimorfismo (Powell et al., 1996).

El uso potencial de tecnologías de automatización para el genotipaje en masa de recursos genéticos en plantas, ha llevado a ser adaptado al análisis con marcadores microsatélites, ya que las ventajas que ofrecen este tipo de marcador aunado a alta sensibilidad de detección reduce los costos y el tiempo del operador y permite la detección de loci que son difíciles de amplificar por PCR (de sus siglas en ingles, *Polymerase Chain Reaction*) (Coburn et al., 2002).

El presente estudio tiene como objetivo principal caracterizar la diversidad genética de 104 accesiones silvestres de la Colección Núcleo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) procedentes de la Unidad de Recursos Genéticos del CIAT (URG-CIAT), mediante el uso de 36 marcadores tipo microsatélites, marcados con etiquetas fluorescentes (Fluorocromos) de diferentes colores, azul, verde, amarillo y rojo, y posteriormente detectados en un secuenciador automático modelo ABI 3730xl.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. GENERALIDADES DEL FRÍJOL

El frijol pertenece a la familia Leguminosae, cuenta con 643 géneros (18000 especies) agrupados en 40 tribus (Broughton et al., 2003). El género *Phaseolus* está integrado por unas 70 especies que han contribuido al bienestar humano con cinco cultígenos domesticados en tiempos precolombinos: *P. vulgaris* L., *P. dumosus* Macfad., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray, y *P. lunatus* L. El género se originó en el continente americano y un gran número de sus especies se encuentra en Mesoamérica y en la parte Andina de Suramérica. Entre la cinco especies domesticadas, *P. vulgaris* aporta más del 90% de los cultivos en todo el mundo y es la leguminosa de grano más ampliamente consumida en el mundo (Acosta-Gallegos et al., 2007).

Phaseolus vulgaris L. es el prototipo del género *Phaseolus*, su nombre científico fue asignado por Lineo en 1753, pero además posee varios nombres vulgares como poroto, alubia, judía, Frixos, nuña, habichuela, vainita, caraota y Feijao. (Debouck and Hidalgo, 1985).

La clasificación taxonómica del frijol común es la siguiente (Gepts, 2001):

Orden	Rosales
Familia	Leguminosae
Subfamilia	Papilionoideae
Tribu	Phaseolae
Subtribu	Phaseolinae
Genero	Phaseolus
Especie	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.

El tallo es herbáceo y con sección cilíndrica o levemente angular, debido a pequeñas corrugaciones de la epidermis. Las ramas se desarrollan a partir de un complejo axilar que generalmente está formado por tres yemas visibles desde el inicio de su desarrollo (Debouck and Hidalgo, 1985).

En el frijol existen hojas simples, que aparecen en el segundo nudo del tallo y se forman en la semilla durante la embriogénesis, y hojas compuestas, siendo las que durante su vida se generaran (Debouck and Hidalgo, 1985).

La inflorescencia es a menudo un pseudoracimo con varias flores de donde solamente algunas pocas producen vainas, una excepción es la habichuela que produce abundantes vainas. Las flores de Papilionáceas pueden ser rosas, purpúreas, blancas o bicolor con o sin rayas y en la base exterior lleva un estandarte muy pronunciado. Las bractéolas sésiles a menudo son más grandes en genotipos mesoamericanos que en andinos y pueden ser cordado, aovado, o

lanceolado. El cáliz de bilabiado es pequeño (<5 mm) con los dos dientes superiores unidos. Las flores son cleistogamas y normalmente se autopolinizan (< 1% es por cruzamiento) (Miklas and Singh, 2007).

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

Según estudios hechos por el programa de frijol en el CIAT, se consideró que los hábitos de crecimiento podrían ser agrupados en cuatro tipos principales (Figura 1): Tipo I, determinado arbustivo; Tipo II, indeterminado arbustivo; Tipo III, indeterminado postrado; Tipo IV, indeterminado trepador (Debouck and Hidalgo, 1985).

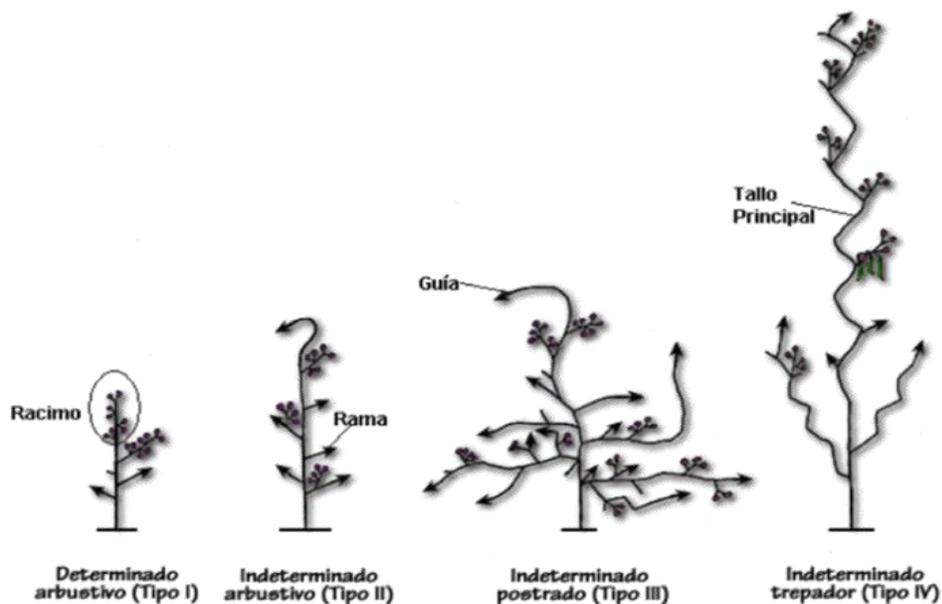


Figura 1. Hábitos de crecimiento de la planta de frijol (Modificada de Debouck y Hidalgo, 1985)

En el frijol las semillas se encuentran contenidas en la vainas o legumbres, las vainas son de diversos colores verde, amarillo, morado, blanco o plateado de acuerdo al estado de madurez de la misma y dependiendo de la variedad. La presencia de fibra en las suturas de las dos valvas determina la dehiscencia que pueden ser de tipo pergaminoso, coriáceo o carnoso (Ríos and Davila, 2002). La vainas maduras presentan generalmente de cinco a ocho semillas (Miklas and Singh, 2007).

Las semillas presentan un alto contenido de proteínas, alrededor del 22% y además, presentan una amplia variación de color (blanco, rojo, crema, negro, café, etc.) y de forma (cilíndrica, de riñón, esférica, o redonda, elíptica u ovoide) y de brillo (brillante, semibrillante y opaco). La combinación de colores también es muy frecuente (jaspeado, moteado, punteado, rayado y venación). La variabilidad de los caracteres externos de la semilla se tienen en cuenta para la clasificación de las variedades de fríjol (Betancour R and Quirós D., 2002).

1.2. CITOLOGÍA

P. vulgaris y una gran mayoría de otros cultivos y especies silvestres de *Phaseolus* son verdaderos organismos diploides con 11 cromosomas ($2n = 2X = 22$ cromosomas). Los cromosomas de *P. vulgaris* son extremadamente pequeños y de similar morfología (Broughton et al., 2003, Miklas and Singh, 2007). Los cromosomas mitóticos y meióticos miden aproximadamente de $1 \pm 3 \mu\text{m}$ y suelen ser metacéntricos y submetacéntricos (Gepts, 2001). El fríjol común posee uno de los genomas más pequeños de la familia Leguminosae con 635 mpb (Miklas and Singh, 2007).

El fríjol tiene un mapa genético bien desarrollado (Blair et al., 2003, Broughton et al., 2003, Freyre et al., 1998, Pedrosa et al., 2002, Grisi et al., 2007) y un gran número de marcadores moleculares que han sido usados para mostrar que *Phaseolus* y *Vigna*, ambos miembros de la subtribu *Phaseolinae*, están estrechamente relacionados, presentando amplia similaridad entre sus genomas (Broughton et al., 2003)

1.3. IMPORTANCIA DEL CULTIVO

1.3.1. Producción y consumo La producción total de fríjol supera los 23 millones de toneladas métricas (TM), de las cuales 7 millones de toneladas se producen en América Latina y África. Los factores sociales y ecológicos pueden determinar las limitaciones del cultivo de fríjol en una región en particular. Una gran parte de la producción de fríjol en América Latina se lleva a cabo en pequeñas granjas que van desde 1 hasta 10 hectáreas. Algunas estimaciones sugieren que hasta un 80% del área sembrada con fríjol común en América Latina se encuentra en las laderas. (Broughton et al., 2003)

En América se encuentran las regiones de mayor producción de fríjol seco (6,7 millones de toneladas). Brasil es el mayor productor con 2,5 millones de toneladas, seguido por EE.UU. con 1,3 millones de toneladas y México con 0,98 millones de toneladas (Miklas and Singh, 2007). La producción ha aumentado sustancialmente en los últimos 50 años en Argentina, Bolivia, Brasil, Canadá y EE.UU. En América Latina, el más alto consumo per cápita de fríjol seco se encuentra en Brasil y México (> 10 kg por año) (Miklas and Singh, 2007).

En el 2005, en Colombia el consumo de frijol por persona fue de 3.86 Kilos. Los cultivos de frijol cubrieron un área de 116.000 hectáreas con una producción de 125 mil toneladas, para un rendimiento promedio de 1.08 Kg/Ha. El 62,84% de la producción se concentra en cinco departamentos así: Antioquia (21,99%), Huila (13,33%), Santander (8,84%), Tolima (11,67%), Bolívar (6,98%) (Velásquez and Giraldo, 2005).

1.3.2. Valor Nutritivo Las semillas de frijol, de acuerdo a la variedad, presentan un promedio de contenido de proteína del 24%, desempeñando un papel esencial en la nutrición humana. La principal proteína del frijol es la faseolina siendo un factor determinante de la cantidad y calidad nutricional; sin embargo las proteínas de semilla son deficientes en aminoácidos esenciales como la lisina y metionina, pero combinado con otros cereales y leguminosas se pueden aliviar estas deficiencias garantizando una dieta balanceada. (Broughton et al., 2003, Ríos and Davila, 2002). Además de proteínas en la semilla de frijol se encuentran glucósidos (55-65%), fibra (3-8%), lípidos (1-5%) y sustancias minerales (3-5 %), se destaca también su elevado contenido de Hierro, Calcio y vitaminas como tiamina (B) y ácido fólico (Rodrigo M., 2000).

Recientemente, se ha descubierto algunas propiedades de la semilla del frijol, demostrando que contribuye positivamente al mejoramiento de ciertos problemas de salud en humanos; como el control de la diabetes tipo II. También, el consumo de semillas de frijol ayuda a bajar los índices de glicemia y colesterol, y además disminuyen la incidencia de ciertos tipos de cánceres (Acosta-Gallegos et al., 2007).

1.3.3. Factores antinutricionales Los factores antinutricionales y sustancias tóxicas están presentes en muchas de las semillas de las legumbres e incluso en diversas partes de la planta, reduciendo la palatabilidad y causando trastornos de diversa índole. Entre ellos están los inhibidores de α -amilasa, argelinas, lectinas, fitatos, sustancias fenólicas y taninos. La cantidad de taninos cambia con el color de la semilla. Las propiedades antinutritivas de fitatos se derivan de su capacidad de quelar calcio, hierro, Magnesio y Zinc. Sin embargo, las arcelinas e inhibidores de α -amilasa confieren a las semillas de frijol propiedades insecticidas. En lo posible se trata de reducir los compuestos antinutricionales, sin disminuir algunas de las funciones de protección, esto podría ser posible a través del análisis de la variabilidad genética (Broughton et al., 2003).

1.3.4. Problemas de Producción Los frijoles producidos en pequeñas parcelas por granjeros con bajos recursos son más vulnerables a ser atacados por enfermedades y plagas, y por estreses abióticos incluyendo sequía y baja fertilidad del suelo. En contraste, los granjeros con altos capitales cuentan con los recursos para combatir estos factores a través del uso de pesticidas, fertilizantes, e irrigación (Miklas, 2005).

La producción de frijol común se ve afectada por factores abióticos y bióticos (Tabla1).

Tabla 1. Problemas de producción del cultivo de frijol común, incidencia y porcentaje de pérdida en rendimiento (Singh, 1999).

PROBLEMA DE PRODUCCIÓN	INCIDENCIA	PERDIDA EN RENDIMIENTO (%)
ABIÓTICO		
Sequía	Global	10 – 100
Baja fertilidad del suelo	Global	30 – 100
BIÓTICO		
Enfermedades		
Virus del mosaico común (BCMV)	Global	50 – 70
Virus del mosaico dorado (BMGV)	Argentina, Brasil, Caribe y América central	50 – 90
Bacteriosis Común (<i>Xanthomonas campestris</i>)	Global	20 – 50
Bacteriosis de Halo (<i>Pseudomonas phaseolica</i>)	Altiplano de África y Latinoamérica, Europa y América del Norte	20 – 50
Mancha angular (<i>Phaseoisariopsis griseola</i>)	África y Latinoamérica	40 – 80
Antracnosis (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>)	Global	10 – 100
Hongos de la raíz	Global	10 – 90
Roya (<i>Uromyces appendiculatus</i>)	Global	40 – 80
Moho blanco (<i>Sclerotinia sclerotium</i>)	Brasil, Argentina y América del Norte	30 – 90
Insectos		
Mosca del frijol (<i>Ophiomya spp.</i>)	África	30 – 100
Picudo de la vaina (<i>Apion godmani</i>)	México y América central	10 – 80
Brúquidos o gorgojos (<i>Zabrotes subfasciatus</i>)	Global	10 – 40
Salta hojas (<i>Empoasca fabae</i>)	Global	10 – 100

- Factores abióticos: La resistencia a estrés abiótico es por naturaleza más complejo fisiológicamente, esta típicamente sujeto a grandes efectos medioambientales (Miklas, 2005). Entre estos se encuentra la baja fertilidad del suelo, que depende de la deficiencia de nitrógeno, fósforo, y zinc, además de la toxicidad con aluminio y manganeso. La sequía afecta la producción en muchas regiones del mundo, especialmente en el noroeste de Brasil, las tierras altas de centro y norte de México, los valles del este de África y las regiones intermontañas de Estados Unidos (Singh, 2001). También las bajas temperaturas (inferiores a 10 °C) ocasionan daños durante el periodo de germinación de la planta.
- Factores bióticos: La resistencia o tolerancia a insectos en frijol común es un rasgo genético cuantitativo y poligénico (Miklas, 2005). Los problemas bióticos son causados principalmente por virus, hongos y bacterias, mientras que entre los causados por plagas se encuentran insectos y nematodos (Singh, 2001).

1.4. ORIGEN, DISTRIBUCIÓN Y DOMESTICACIÓN

El frijol (*Phaseolus spp.* L.) es uno de los cultivos más antiguos del nuevo mundo, es diverso en términos de métodos de cultivo, usos, adaptación, y variabilidad morfológica (Broughton et al., 2003). Desde sus regiones de origen y domesticación en los Andes suramericanos, América Central y México, el frijol común se ha extendido a otras partes de las Américas (de unos 35° a >50° latitud N y desde el nivel del mar a >3000 m de altitud). Posteriormente, se introdujo en África, Asia, Europa y Oceanía (Miklas and Singh, 2007).

Desde finales del siglo XIX se acepta el origen Americano del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Algunas investigaciones arqueológicas han permitido ubicar restos de plantas completamente domesticadas en diversos sitios de Estados Unidos, México y Perú. En la región suroeste de Estados Unidos se han encontrado restos cuya antigüedad datan de unos 2300 años A.P. En México los restos arqueológicos de frijol tienen una antigüedad que fluctúa entre 13000 y 4300 años A.P. En Perú se han encontrado restos con antigüedad de 2500 años A.P. No se conoce con certeza el momento en que se originó la transición completa del estado silvestre al cultivado, debido a la falta de evidencia arqueológica (Voyses, 2000).

Las poblaciones silvestres de frijol común se distribuyen desde el norte de México (Chihuahua) hasta el noroeste de Argentina (San Luís). Sus recursos genéticos existen como un arreglo complejo de acervos genéticos mayores y menores, razas y tipos intermedios, con ocasional introgresión entre tipos silvestres y domesticados (Beebe et al., 1997). El frijol común es un cultivo no céntrico que ha tenido múltiples domesticaciones de sus poblaciones silvestres (Chacon et al., 2005). Los híbridos entre frijoles silvestres y cultivados son plenamente fértiles y

no existen barreras importantes para la introgresión y el intercambio de alelos y QTL's (de sus siglas en ingles, *Quantitative trait locus*) favorables (Miklas and Singh, 2007)

Un centro de domesticación está situado en Mesoamérica, en hábitats mésicos, entre 700 y 2000 msnm, donde algunas poblaciones silvestres presentan semilla pequeña con faseolina tipo "S" y grandes bractéolas. Estas poblaciones dieron origen, a través de la domesticación, plantas con mayor tamaño de semilla que los silvestres y con el mismo tipo de faseolina y grandes bractéolas. El otro centro de domesticación se encuentra en la cordillera de los Andes, donde las poblaciones silvestres actuales presentan semillas más grandes, con predominio de faseolina tipo "T" y bractéolas pequeñas. (Payró-de-la-Cruz et al., 2005).

La reserva genética de las especies parece estar organizada en cuatro razas Mesoamericanas y tres razas Andinas (Tabla 2) (Beebe, 2000, Beebe, 2001).

Tabla 2. Acervo, raza, faseolina y haplotipo de ADNcp características de cada raza domesticada de *Phaseolus vulgaris*.(Acosta-Gallegos et al., 2007)

ACERVO Y RAZA	FASEOLINA	HAPLOTIPO DE ADNcp	CULTIVARES CARACTERÍSTICAS
ANDINO			
Nueva Granada	T	C	Jalo EEP558, California Dark Red Kidney
Chile	C, H	C	Coscorrón, Blanco Español, Frutilla
Perú	T, C, H	C, K	Cargamanto, Bolón Bayo, Nuña Coneja
MESOAMERICANO			
Mesoamérica	S, Sb, B	K, L, I, J	Jamapa, ICA Pijao, Carioca, Black Turtle Soup, Vista, Tío Canela
Durango	S, Sd	K, L, J	Maverick, Sierra, Pinto Villa, Bayo Blanco
Jalisco	S	L, K	Garbancillo Zarco, Rosa de Castilla, Flor de Junio Marcela, Negro San Luís
Guatemala	S	I	Colorado de Teopisca, Bolonillo

Las cuatro razas Mesoamericanas Durango, Jalisco, Mesoamérica y Guatemala difieren en adaptación ecológica, rango geográfico, rasgos morfoagronómicos, alelos de aloenzima, y marcadores tipo RAPD (de sus siglas en ingles, *Random Amplified Polymorphic DNA*) (Beebe, 2000). Sin embargo, la presencia de un predominante tipo electroforético de faseolina S y similares AFLP entre los patrones de las razas de Mesoamérica sugieren una única domesticación (Gepts, 2003, Gepts et al., 1986, Papa et al., 2005, Papa and Gepts, 2003). Las tres razas

Andinas, Nueva Granada, Perú y Chile, también difieren en caracteres morfoagronómicos, alozimas y tipos de faseolina (Singh et al., 1991a), lo que soporta múltiples domesticaciones. Sin embargo, sus límites geográficos se solapan y parecen ser similares los patrones electroforéticos AFLP (Beebe, 2001), apoyando un solo origen.

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

Blair *et al.* en 2006, estimaron la diversidad alélica de 129 microsatélites en un panel de 44 genotipos de frijol. Encontraron dos principales grupos correspondientes al acervo mesoamericano y Andino y subgrupos específicos, denominados razas. Dentro del acervo Andino, la raza Perú tiene mayor diversidad en comparación a la raza Nueva Granada, mientras que en el acervo mesoamericano, las razas Durango, Guatemala y Jalisco tienen niveles de diversidad inferiores a la raza Mesoamérica.

En la determinación de la estructura de raza en clases comerciales del acervo Mesoamericano, Díaz y Blair en el 2006, evaluaron 60 genotipos con 52 marcadores microsatélite; en el análisis de correspondencia se identificaron dos grupos principales equivalentes a la raza Mesoamérica y un grupo que contenía las razas Durango y Jalisco.

En publicaciones recientes Blair et al., 2007, mediante análisis con 33 marcadores tipo microsatélites de los cuales 11 fueron génicos y 22 genómicos, lograron identificar en accesiones representativas del acervo Andino dos grupos predominantes correspondientes a las razas Nueva Granada y Perú, y en menor medida un grupo de accesiones de origen Chileno.

Una de las más importantes y generalizadas características de la domesticación de plantas es la reducción de la diversidad genética que ha caracterizado las reservas genética de los cultivos, no solo durante la fase inicial de domesticación en sí, sino también, posteriormente durante la dispersión desde los centros de domesticación y adicional selección (Gepts, 2004, Papa et al., 2005). Esta reducción es causada por eventos demográficos (por ejemplo, un cuello de botella debido a una reducción en el tamaño de la población) y de selección (por ejemplo, por adaptación a un medio ambiente cultivado), estos afectan la diversidad genética de la población de diferentes maneras. Si bien los acontecimientos demográficos afectan a la diversidad genética a través de todo un genoma, la selección sólo afectará a genes específicos o genes adyacentes (Papa and Gepts, 2003).

Un caso particular sucede en Colombia, ya que por encontrarse ubicada en el extremo nor-occidental de América de Sur se ha considerado como sitio de confluencia de los acervos de frijol común, es por lo anterior que en esta zona se solapan las “zonas de expansión” y algunas de las características agroecológicas de los dos centros de origen, además se ha mostrado intercambio cultural desde épocas precolombinas (Díaz et al., 2005).

1.5. IMPORTANCIA DE ESTABLECER UNA COLECCIÓN NÚCLEO DE GERMOPLASMA

Una colección núcleo se puede definir como un número limitado de accesiones derivadas de una colección base de germoplasma existente y escogidas para representar la diversidad genética de esa colección y así poder usarse en mejoramiento (Brown, 1989, IPGRI, 2000).

Las colecciones núcleo son importantes en el uso de los recursos genéticos y ofrecen distintas ventajas, ya que contiene el material prioritario para la mejora y el más apropiado para desarrollar una lista de descriptores. Para el mantenimiento de este tipo de colecciones es necesario seguir unas normas con las que se disminuya la pérdida de la integridad genética en la entrada de semilla durante su almacenamiento y regeneración, y es así en lo posible mantener altos niveles de viabilidad y control de enfermedades (IPGRI, 2000).

El tamaño de la Colección Núcleo debe ser tal que permita retener en ella la mayor cantidad de alelos posibles. Brown (1989) determinó que una muestra del 10% de la población retuvo, con un 95% de confianza, por lo menos un 70% de los alelos presentes en ella.

El objetivo de la conservación ex situ consiste en mantener sin cambio la adhesión en lo que respecta a su constitución genética. Los métodos utilizados están diseñados para reducir al mínimo la posibilidad de cambios que se produzcan a través de la mutación, selección aleatoria de deriva o la contaminación. Para muchas especies cultivadas y sus parientes silvestres, la conservación ex situ pueden llevarse a cabo utilizando las semillas de las especies que pueden ser almacenados por largos períodos de tiempo (hasta cientos de años) a bajas temperaturas y baja humedad (Hodgkin, 1995).

1.6. VALOR DEL GERMOPLASMA SILVESTRE

La variación genética es esencial para el desarrollo de cultivares mejoradas. El conocimiento, acceso y uso de la diversidad disponible en especies domesticadas y silvestres son necesarios para la ampliación de la base genética de cultivares para el sostenimiento de características mejoradas. En el proceso de domesticación se reduce la variación genética y las prácticas intensivas de cultivo

en los países industrializados ha reducido esta variabilidad (Acosta-Gallegos et al., 2007).

Algunos rasgos existentes en las poblaciones silvestres son subrepresentadas en las formas domesticadas de *P. vulgaris*. Los frijoles silvestres han coexistido con plagas y patógenos en una escala de tiempo evolutivo, desarrollando resistencias, aunque en una baja frecuencia en su hábitat natural, como se conoce en el caso de la proteína de semilla arcelina donde unos pocos individuos en una población llevan el alelo de resistencia (Tabla 3). Los silvestres de frijol común se extienden a través de muchos nichos ecológicos incluidas zonas semiáridas de entornos tropicales húmedos. Al ser capaz de colonizar tan diversos nichos, el frijol silvestre debe poseer una amplia gama de rasgos adaptativos, algunos de los cuales no están presentes en cultivos debido a los cuellos de botella inducidos por la domesticación (Acosta-Gallegos et al., 2007).

Tabla 3. Algunos rasgos de interés de silvestres de *P. vulgaris* (Acosta-Gallegos et al., 2007)

RASGO	COMENTARIO
Resistencia contra brúquidos	APA: arcelina–fitohemaglutinina– α -amilasa inhibidor
Resistencia a insectos	Resistencia a gorgojo en frijol mexicano
Contenido mineral	Alto contenido de Ca, N, Fe, y Zn en poblaciones silvestres que formas domesticadas.
<i>Balance de aminoácidos</i>	El balance esencial de aminoácidos

1.7. MARCADORES GENÉTICOS

Un marcador genético es un carácter cuantificable que puede detectar variación, ya sea en una proteína o en una secuencia de ADN. Una diferencia, bien sea fenotípica o genotípica, puede actuar como marcador genético si identifica en un individuo características del genotipo, del fenotipo, o de ambos y si, además, puede hacerse seguimiento a su herencia a través de varias generaciones (De Vicente, 2004).

Los marcadores genéticos representan diferencias entre especies u organismos individuales. Estos marcadores actúan como señales o indicadores de posiciones de genes “blanco” a través del genoma. Los marcadores genéticos que están

cercanos a los genes (estrechamente ligados) son regiones conservadas que no afectan directamente el fenotipo de los rasgos de interés pero si se encuentran asociados con él (Collard et al., 2005)

En la actualidad se emplean tres tipos de marcadores genéticos que son de gran utilidad en estudios sobre caracterización y determinación de la diversidad genética, estos son:

- Marcadores morfoagronómicos.
- Marcadores bioquímicos.
- Marcadores moleculares (marcadores de ADN).

1.7.1. Marcadores morfológicos o morfoagronómicos Son características fenotípicas de fácil identificación visual tales como forma, color, tamaño o altura. Muchos de ellos se convierten en importantes «descriptores», a la hora de inscribir nuevas variedades. Este tipo de marcadores contribuyó significativamente al desarrollo teórico del ligamiento genético y a la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos (Picca et al., 2004)

Las principales limitaciones de los marcadores morfológicos se encuentran en: i) número reducido de marcadores disponibles en cada población, ii) bajo nivel de polimorfismo, iii) pueden producir alteraciones fenotípicas que dificultan el desarrollo de la planta, iv) varios se hallan bajo control poligénico, v) dominancia, vi) muchos de ellos se expresan en estadio de planta adulta, lo cual prolonga los tiempos de evaluación en los programas de mejoramiento, vii) influenciados por el medio ambiente. No obstante, los marcadores morfológicos permanecen como caracteres útiles en la identificación de materiales dado que representan un conjunto de genes que pueden ser evaluados con métodos sencillos y a bajo costo (Picca et al., 2004)

1.7.2. Marcadores bioquímicos: Caso Faseolina La faseolina ha sido un marcador bioquímico particularmente informativo en estudios de diversidad genético y evolutivo en frijol común, para ambas formas silvestres y cultivadas (Gepts and Bliss, 1986). Con este marcador se ha afianzado la relación existente entre el tipo de faseolina y el origen geográfico, consolidando la teoría de dos centros de domesticación (Gepts, 1988).

La faseolina, es la mayor proteína de reserva de la semilla de *Phaseolus vulgaris*. La variación genética del locus de faseolina (Pha), ha permitido identificar patrones de domesticación múltiples y una reducción de la diversidad genética durante la domesticación del frijol común (Kami et al., 1995)

Koenig et al. (1990), encontraron en accesiones silvestres de Argentina un nuevo tipo de faseolina designada como “J” (Jujuy), así mismo en una accesión del Norte

del Perú un tipo de faseolina identificada como I (Inca). La faseolina “H” y “C”, previamente identificadas en cultivares, se observaron en accesiones silvestres de Argentina.

1.7.3. Marcadores moleculares Se define como marcador molecular a todo fenotipo molecular procedente de la expresión de un gen o de la caracterización de segmentos específicos de ADN. La secuencia de nucleótidos de un marcador molecular puede o no ser conocida. Cuando se verifica su comportamiento de acuerdo a las leyes básicas de la herencia de Mendel, se define a un marcador molecular como un marcador genético (Ferreira and Grattapaglia, 1998). Los marcadores de ADN son el tipo de marcador más ampliamente usado debido a su abundancia. Ellos surgen de diferentes clases de mutaciones de ADN tales como mutaciones por sustitución (mutaciones puntuales), rearrreglos (inserciones o deleciones) o errores en la replicación de repeticiones en tándem del ADN. Estos marcadores son selectivamente neutrales ya que ellos usualmente están localizados en regiones no codificantes del ADN, y en baja frecuencia en regiones codificantes. Dentro de los usos de este tipo de marcadores se encuentran, la elaboración de mapas de ligamiento y evaluación del nivel de diversidad genética (Collard et al., 2005).

En la tabla 4, se resumen aspectos importantes a considerar a la hora de elegir el tipo de marcador a utilizar.

Tabla 4. Comparación entre algunos sistemas de marcadores moleculares (Picca et al., 2004).

ATRIBUTO / MARCADOR	RAPD	RFLP	AFLP	SSR	SCAR
Cant. ADN requerido	+	+++	++	+	+
Robustez	+	+++	++	+++	++
Polimorfismo	+	+	++	+++	++
Costo	+	+++	++	++	++
Tiempo	+	+++	++	+++	+
Facilidad de aplicación	+++	+	++	+++	+++
Posib. de automatización	++	+	+++	+++	++

+: Bajo; ++: Medio; +++: Alto

1.7.3.1. Microsatélites. Uno de los marcadores más importantes basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son los microsatélites o SSRs (des sus siglas en ingles, *simple sequence repeat*). Los microsatélites consisten en unidades repetidas en tándem de motivos cortos de nucleótidos que son repeticiones de 1-6 pares de bases. Repeticiones di, tri y tetranucleótidas son las más comunes y ampliamente distribuida a través del genoma (Powell et al., 1996). De acuerdo al diseño de su secuencia se pueden clasificar en genómicos y génicos, los primeros se diseñan a partir de secuencias de regiones no

codificantes del genoma tales como los intrones y espacios intergénicos, y los segundos, a partir de secuencias codificantes en los genes (Varshney et al., 2005).

El polimorfismo en los marcadores tipo microsatélite sucede debido a que en estas regiones repetidas existen altas tasas de eventos mutacionales durante la replicación del ADN. Estos errores se producen cuando una de las cadenas se desliza o se corre la una sobre la otra en al menos un motivo, originando un mal apareamiento de las mismas y de esta manera ocurre un cambio en el número de repeticiones. El aumento de estas regiones resulta en la ganancia de unidades repetidas a través del tiempo. Debido a que las mutaciones agregan o sustraen lentamente unidades repetitivas a un arreglo de microsatélites en particular, una serie de alelos de diferente tamaño (número de repeticiones) aparecen en la población (You-Chun Li, 2002, Li et al., 2002)

El desarrollo y la aplicación de SSRs facilitan la adquisición de una gran cantidad de información genética de importancia para la identificación del genotipo, y por lo tanto, proporciona una oportunidad para caracterizar las colecciones de germoplasma. En concreto estos tienen un alto poder discriminatorio, un alto contenido de la información que se derivan de su naturaleza multialélica, transmisión codominantes, ensayo robusto y reproducible, su abundancia relativa con una cobertura uniforme del genoma, la pequeña cantidad de ADN plantilla necesaria, y su fácil detección a través de sistemas automatizados (Masi et al., 2003).

La metodología consiste en utilizar cebadores específicos para amplificar el microsatélite por PCR, hacer electroforesis en geles de poliacrilamida de las muestras amplificadas y teñir los fragmentos con una técnica con plata. Actualmente, el análisis de los microsatélites se puede realizar en un secuenciador automático marcado uno de los cebadores con un fluoróforo que emite una coloración específica que permite identificar los alelos del microsatélite con precisión; este método ha demostrado ser económico y eficiente (Blair et al., 2002).

En el diseño de paneles de microsatélites marcados con fluorocromos se debe tener en cuenta que los marcadores etiquetados con el mismo fluorocromo deben tener diferente tamaño, mientras que los marcadores que se sobrelapan en tamaño deben ser diferenciados mediante el uso de colores diferentes. Varios marcadores pueden ser mezclados después de la amplificación o bien amplificados juntos en una reacción común de PCR (Blair et al., 2002).

En la tabla 5 aparecen las diferentes etiquetas fluorescente disponibles para la detección y determinación de varios tamaños de distintos fragmentos en una sola carrera electroforética. El tipo de marcaje está condicionado por el tipo de analizador de ADN (Joe et al., 2004).

Tabla 5. Set de tintes estándar Applied Biosystems para aplicaciones de genotipaje.

Set de Tintes	DS-02	DS-20	DS-30	DS-31	DS-32	DS-33	DS-34	DS-40
Filtro	E5	A	D	D	F	G5	C	S
Tinte Azul	dR110	5-FAM™	6-FAM™	6-FAM	5-FAM	6-FAM	6-FAM	6-FAM
Tinte Verde	dR6G	JOE™	HEX™	VIC®	JOE	VIC	TET™	dR6G
Tinte Amarillo	dTAMRA™	TAMRA™	NED™	NED	NED	NED	HEX	
Tinte Rojo	dROX™	ROX™	ROX	ROX	ROX	PET®	TAMRA	
Tinte Naranja	LIZ®					LIZ		LIZ

Para incrementar la información por SSR analizado, se pueden realizar combinaciones (múltiplex) de marcadores en un mismo panel, lo cual puede incrementar el contenido de información de cada reacción de PCR y la eficiencia, ya que tiene en cuenta muchos fragmentos de ADN polimórficos y representa diferentes loci a lo largo del genoma (Masi et al., 2003).

En frijol común, los microsatélites han sido desarrollado principalmente a través de SSR de librerías enriquecidas para secuencias que contienen repeticiones GA, CA, AT o ATA (Benchimol et al., 2007, Campos et al., 2007, Gaitán-Solís et al., 2002, Métais et al., 2002, Blair et al., 2008) y mediante la búsqueda de colecciones de EST o secuencias de genes (Blair et al., 2003, Yu et al., 2000). Blair et al. (2006), evaluaron un set de 129 microsatélites tanto génicos como genómicos para establecer su capacidad de diferenciación y así igualmente utilizarlos en estudios de diversidad. Los resultados obtenidos confirmaron el uso de estos microsatélites para diferenciar los genotipos Andinos de los Mesoamericanos.

1.7.3.2. AFLP (Amplified fragment length polymorphism). La técnica AFLP se basa en la amplificación selectiva, vía PCR, de fragmentos de restricción de DNA genómico. La técnica comprende cuatro etapas:

1. Generación de fragmentos de restricción de DNA genómico.
2. Ligación de adaptadores específicos a los fragmentos.
3. Amplificación selectiva de un grupo de fragmentos vía PCR.
4. Separación de los fragmentos amplificados por electroforesis y análisis de los fragmentos amplificados.

La base molecular de los polimorfismos de AFLP generalmente se origina en los nucleótidos. Se detectan cambios de un solo nucleótido cuando: (1) se afectan los propios sitios de restricción; y (2) se afectan los nucleótidos adyacentes a los sitios de restricción, lo que hará que los cebadores hibriden erróneamente en el extremo 3' impidiendo la amplificación (IPGRI y Cornell University, 2003).

La mayoría de los marcadores de AFLP son de tipo mono-alélico, lo que significa que sólo se podrá registrar un alelo porque su alelo complementario no se detecta. Aunque es poco frecuente, se pueden identificar marcadores bi-alélicos como resultado de pequeñas inserciones o deleciones en los fragmentos de restricción (IPGRI y Cornell University, 2003).

Los AFLPs, al igual que los RAPDs, son marcadores dominantes, lo cual no permite diferenciar individuos homocigotos de heterocigotos. El poder de la técnica de AFLP se basa en las variaciones genéticas que existen entre especies, variedades o cultivares estrechamente relacionados. Estas variaciones en su secuencia de DNA son explotadas por esta técnica para la obtención rutinaria de "fingerprintings" (huellas dactilares) de un genotipo en particular. Estos "fingerprintings" son simples AFLPs amplificados selectivamente vía PCR (Vos et al., 1995).

La tecnología de AFLP puede aplicarse a cualquier muestra de ADN, incluyendo el humano, el animal, el vegetal y el microbiano, lo que le da el potencial de convertirse en un sistema universal para la caracterización de ADN. Debido a la naturaleza de los cebadores de AFLP, los marcadores obtenidos son sumamente confiables y sólidos, y no son afectados por las pequeñas variaciones del proceso de amplificación. Una "huella identificadora" característica de AFLP contiene entre 50 y 100 fragmentos amplificados, muchos de los cuales pueden servir como marcadores genéticos (Vos et al., 1995).

La generación de perfiles de transcripción de AFLP con ADNc es una herramienta eficaz para identificar los ARNm expresados diferencialmente. Esta herramienta tiene ventajas que pueden ser útiles para descubrir genes en el germoplasma (IPGRI y Cornell University, 2003).

Un inconveniente adicional de la tecnología de AFLP es, quizás, que no puede garantizar la homología entre bandas de peso molecular (MW) similar, lo que dificulta los estudios del tipo del análisis filogenético. Ahora bien, mientras bandas no homólogas de peso similar también se encuentran utilizando otros marcadores como los RAPD, pueden ser menos comunes en la tecnología de AFLP porque la resolución de los geles es muy alta y, en consecuencia, la probabilidad de que las bandas no homólogas sean, por coincidencia, del mismo peso molecular es más baja (IPGRI y Cornell University, 2003).

1.8. ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN FRÍJOL COMÚN SILVESTRE

Numerosos han sido los estudios desarrollados mediante técnicas de marcadores genéticos con el fin de caracterizar la estructura y diversidad de las poblaciones de silvestres (Tabla 6) y cultivados de frijol común. En general, se han sentado bases

concretas de la existencia de dos principales acervos genéticos ubicados en Mesoamérica y la región Andina de Suramérica.

Tabla 6. Estudios de Diversidad genética realizados en silvestres de *Phaseolus vulgaris* L.

Autores	Tipo de marcador	No. de marcadores	No. de genotipos
Becerra y Gepts, 1994	RFLP	12	85
Chacón et al., 2005	RFLP DNACp	10 (14)	322
Chacón et al., 2007 (Filogeografía)	RFLP DNACp	10 (14)	157
Gepts et al., 1986	Faseolina	1	205
Gepts et al. 1988	Faseolina	1 (3)	148
Gepts y Bliss, 1986	Faseolina	1 (4)	85
Santalla et al., 2004	Faseolina/Alozima	2	35
Koening y Gepts 1989	Isoenzimas	9(14)	83
Singh et al., 1991a	Isoenzimas	9 (19)	227
Freyre et al., 1996	RAPD	14 (90)	77
Cattan-Toupance et al., 1998 (Andes)	Faseolina/RAPD	63	128
Duarte et al., 1999 (Razas)	RAPD	33 (265)	27
Payró de la cruz et al. 2004 (México)	Morfológico/ISSR	3 (37)	179
Tohme et al.1996 (core)	AFLP	17 (110)	114
Galván et al., 2006	Morfológico/RAPDS	(9) 33	10
Kwak y Gepts, 2009	SSR	26	349

En 1986, Gepts et al. demostraron que las formas silvestres de frijol común estudiados desde el Norte de México hasta el Sur de Argentina, mostraron una mayor diversidad en el patrón de faseolina que las formas cultivadas. Estas últimas mostraron sólo faseolina de tipo S, T, C y H, en donde la S predominó en Mesoamérica y la T en América Andina.

Lynch et al., 1992, examinó germoplasma silvestre de frijol para localizar variaciones potencialmente útiles en las características fotosintéticas de hoja, con especial atención en su PSNUES (su siglas en ingles, *photosynthetic nitrogen-use efficiency*). El tamaño de hoja, la densidad estomatal adaxial y el rango de cambio de CO₂, fueron útiles para determinar los orígenes de accesiones de frijol silvestre en uno de las cuatro principales áreas: México, Guatemala, Perú y Argentina.

En otro estudios se examinó la diversidad intraespecífica del ADN mitocondrial entre líneas silvestres y cultivadas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) mediante la técnica de RFLP (de sus siglas en inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) indicando que el polimorfismo surgió después de la domesticación. Además, que las accesiones silvestres de Suramérica fueron distintas y menos

variables que las accesiones silvestre es del Norte de los Andes y Mesoamérica (Khairalla et al., 1992)

En análisis mediante la técnica de AFLP Thome et al. (1996) analizaron 114 accesiones silvestres de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de la Colección Núcleo del CIAT evaluando la estructura genética de las poblaciones silvestres de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), lo que permitió conocer que las accesiones colombianas aparentemente están altamente introgresadas con germoplasma de otras áreas, también que la poblaciones silvestres en la zona Andina han sido aisladas la una de otra, resultando en poblaciones discretas.

Beebe et al. (2001) encontraron evidencia basada en datos morfológicos y faseolina de frijoles silvestres y cultivados que sugieren la existencia de un acervo genético menor en el norte de los Andes que es de hecho distinto, aunque es morfológicamente similar a la raza Mesoamérica.

Mediante marcadores de faseolina y alozimas, Santalla et al. (2004) indicaron por estudio comparativo de cultivares primitivas Andinas y poblaciones silvestres que la Argentina posee un gran base genética del Acervo Andino. A esto se le suma la existencia de poblaciones introgresadas con formas silvestres simpátricas.

Payró et al. (2004), analizaron por medio de características morfológicas e ISSRs (de sus siglas en ingles, *Inter-Simple Sequence Repeat*) la diversidad, estructura genética y flujo génico de las poblaciones silvestres en el área Mesoamericana de domesticación. Con lo anterior, sugieren que el flujo de genes se está llevando a cabo desde poblaciones domesticas hacia silvestres, dado por las actividades agrícolas, influyendo la magnitud y características del flujo de genes, y junto con esto la diferenciación de las poblaciones silvestres.

Galván et al. (2006) estudio la diversidad genética de poblaciones silvestres de *Phaseolus vulgaris* var. aborigineus desde el noroeste de Argentina analizados por medio de marcadores RAPD y datos morfo-agronómicos encontrando que los niveles de diversidad mostrado entre las poblaciones fueron bajas sugiriendo un ancestro común y los niveles de diversidad mostrada por datos morfoagronómicos fueron mayores en comparación con los de los marcadores moleculares, muy probablemente debido al efecto del medio ambiente.

El estudio del polimorfismo del ADN de Cloroplasto de 165 accesiones silvestres colectadas de diferentes países de América realizado por Chacón et al. (2005) arrojó 14 diferentes haplotipo en frijol silvestres y de los cuales 5 se producen en frijoles domesticados.

Chacón et al. (2007) mediante análisis filogeográfico de la variación de ADN de cloroplasto a través de RFLP, sugiere al menos dos acontecimientos dispersión/expansión de frijol silvestre entre Suramérica y Mesoamérica y en ambas

direcciones un movimiento hacia el sur de México a América del Sur y otro desde el norte de América del Sur a América Central.

Kwak y Gepts (2009) mediante análisis con marcadores microsatélites detectaron en silvestres los dos principales acervos genéticos: Mesoamérica y Andino, y un tercer centro denominado Ecuador-Norte del Perú clasificado como una población Mesoamericana. Las distancias genéticas y geográficas en poblaciones silvestres fueron congruentes con excepción de unos pocos presuntos híbridos, sugiriendo un predominante efecto de aislamiento por distancia.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la diversidad genética de 104 accesiones silvestres de la Colección Núcleo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) procedentes de la Unidad de Recursos Genéticos del CIAT (URG-CIAT), mediante el uso de marcadores moleculares tipo microsatélites analizados con una técnica de fluorescencia.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el polimorfismo alélico en 104 accesiones silvestres de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) analizados con microsatélites marcados fluorescentemente.
- Estimar el grado de relación que presentan entre si los diferentes accesiones silvestres de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) mediante su similaridad.
- Analizar la variabilidad genética entre cada uno de las agrupaciones encontradas en el estudio.
- Comparar las técnicas moleculares de AFLP y SSR en su utilidad al detectar la diversidad genética dentro de una colección de silvestres de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN

El presente trabajo se desarrollo en el Laboratorio de Caracterización de Germoplasma de Fríjol (LCGF), ubicado en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), situado en el municipio de Palmira, departamento del Valle del Cauca, Colombia (Latitud 3°30.26", Longitud 76°21.36", altitud 965 msnm).

3.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Para el desarrollo de este estudio se evaluaron 108 accesiones, 104 accesiones silvestres, y 4 cultivares como controles de diversidad (Figura 2) representantes de los dos principales acervos: DOR364 (Dorado) y G5773 (ICAPijao), del acervo Mesoamericano, y G19833 (ChauchaChuga) y G4494 (Calima), del acervo Andino. Las accesiones silvestres utilizadas se seleccionaron de los países de México, El Salvador, Guatemala, Costa Rica, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Argentina (Tabla 7).

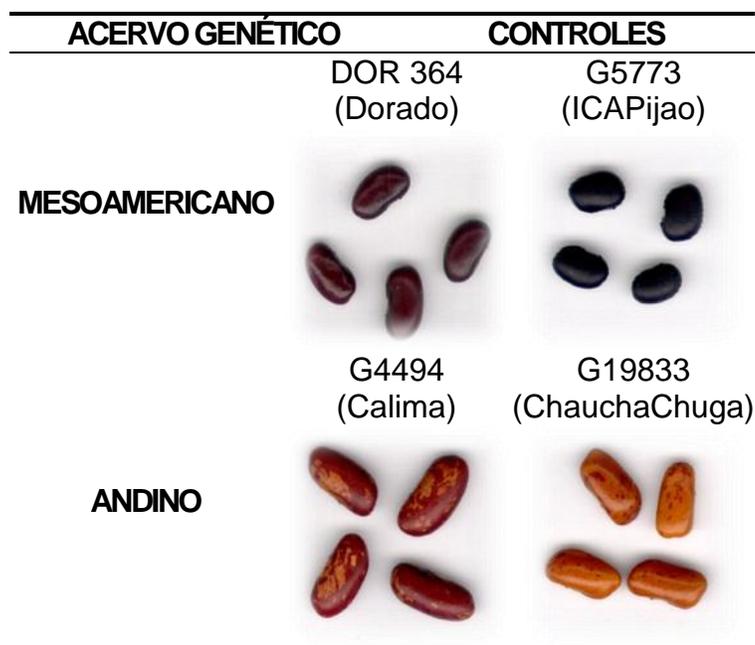


Figura 2. Controles de diversidad por acervo genético.

Estas accesiones hacen parte de la Colección Núcleo de silvestres provenientes de la Colección Total de *Phaseolus vulgaris* L. del CIAT, las cuales fueron seleccionados con base en condiciones agro-ecológicas (variabilidad en la precipitación, suelo, temperatura y tiempo de floración en su lugar de origen (Tohme et al., 1996).

Tabla 7. País de origen y controles utilizados en el estudio de diversidad de las accesiones silvestres de *Phaseolus vulgaris*.

PAÍS	No. de Accesiones	%
Argentina	10	9.6
Bolivia	3	2.9
Colombia	11	10.6
Costa Rica	1	1.0
Ecuador	5	4.8
El Salvador	1	1.0
Guatemala	11	10.6
México	45	43.3
Perú	17	16.3
TOTAL	104	100.0
CONTROLES		
CIAT	DOR 364	
	G4494	
Colombia	G5773	
Perú	G1933	

La semilla fue suministrada por la Unidad de Recursos Genéticos del CIAT, donde se encontraban almacenadas en el cuarto de conservación de semillas.

3.2.1. Germinación de semilla Para cada genotipo se escogieron al azar diez semillas, se escarificaron haciendo un pequeño corte a la testa hacia el lado opuesto del micrópilo, con el objetivo de acelerar el proceso de imbibición en la semilla. Estas se llevaron a casa de malla para sembrarse en potes llenados con tierra previamente tratada y esterilizada (Figura 3).



Figura 3. Colección de accesiones silvestres germinadas en casa de malla

De los individuos germinados se colectaron los primeros trifolios por accesión y se distribuyeron en dos tubos para microcentrifuga de 2 ml, y se almacenaron en freezer de -80°C.

3.2.2. Procesamiento del material vegetal El material colectado se liofilizó en un Freeze Dryer MODULYoD-115-Thermo® (Figura 4) durante dos días para deshidratar totalmente el tejido. Las muestras ya secas se maceraron con mortero, hasta obtener un polvo fino (Figura 5).



Figura 4. Máquina liofilizadora con muestras en el interior.



Figura 5. Maceración de la muestra secada en liofilizador.

3.2.3. Extracción y cuantificación de ADN El material macerado se mezcló por cada genotipo en un solo tubo eppendorf de 2.0 ml. La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo el protocolo del kit de extracción de ADN vegetal de la casa comercial Viogene® Cat.: GPG1002 (Anexo A).

En la cuantificación del ADN total se preparó un gel de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de Etidio, se sembró en cada pozo una mezcla de 2 µl de ADN, 7 µl de agua HPLC y 3 µl de buffer Blue Juice (Glicerol + Azul de bromofenol) y el gel se corrió en Tris Borato EDTA 0.5X (TBE) a 100 V durante 30 minutos. Posteriormente se llevó el gel a un transiluminador de luz U.V. para evaluar la calidad de las bandas y descartar la presencia de posibles muestras degradadas. Se capturó la imagen del gel con la Cámara para Geles de Agarosa GelDoc 2000-Bio-Rad® y se procedió a la cuantificación de la concentración de ADN, con la ayuda del software Quantity One® v 4.0.3. Este programa calcula la cantidad de ADN en cada una de las bandas, de acuerdo a las extrapolaciones que realiza con los patrones de concentración de ADN lambda de 25, 50, 100, 200 y 400.

Después de obtener los valores de la concentración de ADN se homogenizó la

concentración de todas las muestras para efectuar la amplificación del ADN blanco vía PCR. Para ello, se efectuaron los cálculos para diluir cada muestra en agua HPLC a razón de 5 ng/ml en un volumen final de 300 µl.

Tabla 8. Cebadores fluorescentes evaluados

Marcador	Motivo	Fluorescencia	Panel
GENOMICOS			
AG01	(GA) ₈ GGTA(GA) ₅ GGGGACG(AG) ₄	VIC	7a
BM137	(CT) ₃₃	VIC	8a
BM139	(CT) ₂₅	PET	6a
BM140	(GA) ₃₀	6-FAM	7a
BM141	(GA) ₂₉	6-FAM	8b
BM143	(GA) ₃₅	PET	8a
BM149	(TGC) ₆ (TAG) ₃	6-FAM	8a
BM156	(CT) ₃₂	6-FAM	6a
BM160	(GA) ₁₅ (GAA) ₅	NED	6a
BM172	(GA) ₂₃	PET	5a
BM175	(AT) ₅ (GA) ₁₉	VIC	5b
BM183	(TC) ₁₄	NED	7b
BM187	(CT) ₁₀ T(CT) ₁₄	VIC	7b
BM188-A	(CA) ₁₈ (TA) ₇	NED	5b
BM188-B	(CA) ₁₈ (TA) ₇	NED	5b
BM200	(AG) ₁₀	6-FAM	5b
BM201	(GA) ₁₅	PET	7a
BM205	(GT) ₁₁	PET	5b
GATS54	(GA) ₅ AACAGAGT(GA) ₈	NED	7a
GATS91	(GA) ₁₁	6-FAM	5a
GENICOS			
BMd01	(AT) ₉	6-FAM	6b
BMd02	(CGG) ₈	PET	6b
BMd08	(CT) ₇	NED	5a
BMd15	(AG) ₆	NED	8b
BMd16	(CATG) ₄	VIC	6b
BMd17	(CGCCAC) ₆	PET	7b
BMd18	(TGAA) ₃	6-FAM	9a
BMd20	(TA) ₅	VIC	5a
BMd46	(TCT) ₄	NED	8a
BMd47	(AT) ₅	PET	8b
BMd51	(CT) ₅	PET	9a
BMd56	(AT) ₅	NED	9a
PV-AG003	(AG) ₈	NED	6b
PV-AT001	(TA) ₂₂	6-FAM	7b
PV-AT003	(AT) ₄ (T) ₂	VIC	9a
PVCCT001	(AT) ₁₂	VIC	8b
PV-CTT001	(CTT)	VIC	6a
PET: rojo, VIC: verde, 6-FAM: azul, NED: amarillo			

3.2.4. Amplificación de microsatélites por PCR Para la caracterización molecular de los genotipos se utilizaron 36 marcadores microsatélites, donde cada uno tiene marcado el primer forward (5') con uno de los fluorocromos 6-FAM, NED, PET o TET, distribuidos en nueve paneles compuestos cada uno de cuatro microsatélites

de fluorocromo diferente (Tabla 8). De estos microsatélites seleccionados 17 fueron diseñados a partir de regiones codificantes (génicos) y 19 no codificantes (genómicos) de *Phaseolus vulgaris*. Los microsatélites fueron diseñados por (Blair et al., 2003, Gaitán-Solís et al., 2002, Yu et al., 1999). Estos microsatélites se seleccionaron con base a su peso molecular, contenido de información polimórfica, confiabilidad de señal de amplificación, proximidad a genes conocidos de resistencia y distribución en el genoma (Com. Per. Blair, 2008) (Anexo B).

Las reacciones de PCR se realizaron por separado para cada cebador con un volumen final de 15 µl, mezclando 20 ng de ADN, 3 pmol/Rx de cada primer (forwad y reverse), 0.6 mM de dNTPs, 1X de buffer de PCR (10 mM de Tris HCl pH 8.8, 50 mM de KCl, 0.1% de TritonX-100), 1.5 mM de MgCl₂ y 1 U de Taq (dilución 1:4). Sin embargo, en algunos cebadores se utilizó 2.0 mM de MgCl₂. La amplificación de los microsatélites se llevo a cabo en el Laboratorio de Caracterización de Germoplasma de Frijol (LCGF), utilizándose los termocicladores programables PTC-100® y PTC-200® (MJ Research). El programa de PCR utilizado consta de una denaturación fuerte de 95°C por 3 minutos, seguido por 28 ciclos de una denaturación de 95°C por 40 segundos, un anillamiento de 50°C a 55 °C por 40 segundos y una extensión de 72°C por 1 minuto, y una extensión final de 72°C por 1 hora.

3.2.5. Control de calidad de la amplificación Para el control de calidad del producto amplificado, se preparó geles en agarosa al 1,5%, teñido con Bromuro de Etidio. Se tomó una alícuota de 5µl del producto amplificado y se mezcló con 3µl de Blue Juice, se corrió las muestras por electroforesis horizontal (TBE 0.5X) a 100 V durante 20 minutos. Posteriormente se llevó el gel a un transiluminador de luz U.V. para evaluar la presencia de bandas e intensidad del amplificado (Figura 6)

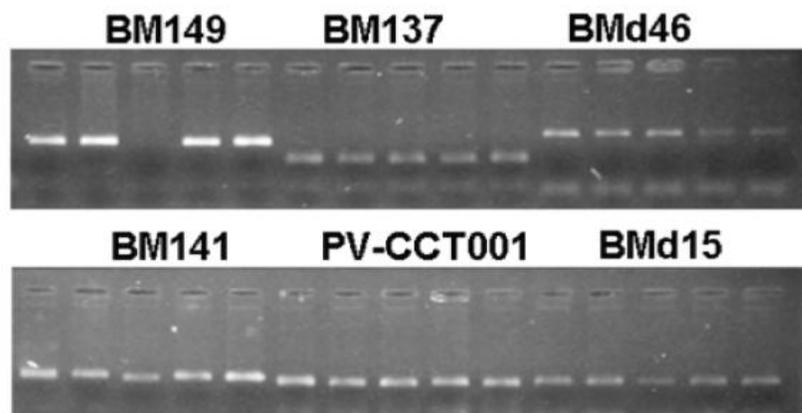


Figura 6. Control de amplificación de algunos marcadores microsatélites fluorescentes realizado en Agarosa al 1%

3.2.6. Agrupación de las muestras Muchos marcadores pueden ser mezclados después de la amplificación o bien amplificados juntos en una reacción común de PCR (Blair et al., 2002). Por lo anterior se mezclaron los productos de PCR de un mismo individuo en una nueva placa de 96 pozos, cuidando que pertenecieran los marcadores a un mismo panel, se adicionó 2 μl de cada producto amplificado y 4 μl para los marcadores con baja amplificación. Después, en una placa nueva se agregó una alícuota de 1.0 μl de la mezcla anteriormente descrita y se diluyó en 3 μl de $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$.

Finalmente, la placa con productos de PCR mezclados se sometió a secado por 1 hora, a 30°C en una centrífuga concentrador a vacío (speedvac) de marca eppendorf Centrifuge 5417c. Las placas fueron empacas y enviadas al centro de recursos biotecnológicos (BRC) de la Universidad de Cornell NY-USA, para el análisis automático de los microsatélites marcados con fluorocromos a través del secuenciador de ADN Applied Biosystem 3730xl (Applied Biosystem, Foster City, Calif). En este lugar, las placas se rehidrataron, de la mezcla resuspendida se alicuotaron de cada muestra 0.5 μl para adicionarlo con 9 μl de Formamida Hi Di mix, 0.06 μl del marcador de peso estándar GeneScan-500LIZ (Applied Biosystems) y 0.44 μl de ddH₂O, para un volumen final de 10 μl por reacción. La muestra en la nueva placa la denaturaron a 94°C durante tres minutos para que finalmente ser leída por capilaridad en el secuenciador ABI 3730xl.

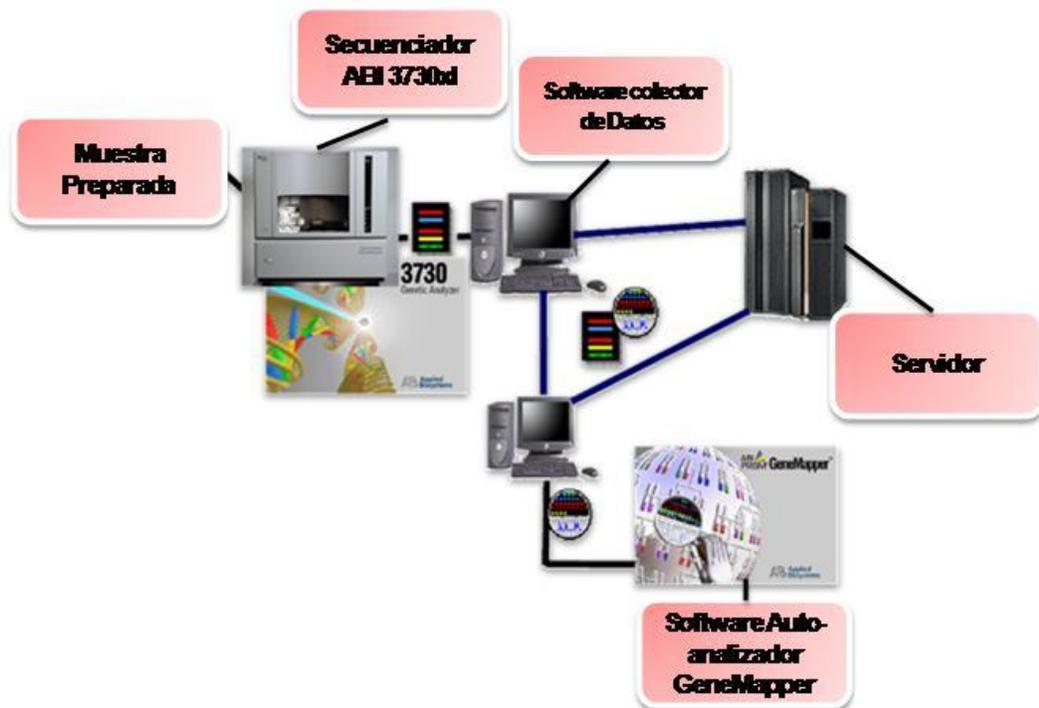


Figura 7. Diagrama del procedimiento que sigue la muestra a analizar (Joe et al., 2005)

3.2.7. Detección y estimación de alelos El tamaño de los alelos, en pares de bases, fue estimado mediante el software GeneMapper® versión 3.7 (Applied Biosystems) (Figura 7). Después, se descargaron los datos de alelos para cada genotipo en cada uno de los loci, organizándose en un archivo Excel Microsoft® office. Subsiguientemente, se corrió el programa de AlleloBin (ICRISAT) para cada uno de los genotipos. Este programa comprueba, si los tamaños de fragmentos observados se ajustan al tamaño de alelos esperados basados en las unidades de longitud repetidas en el microsatélite (Idury and Cardon, 1997).

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.3.1. Matriz de distancias genéticas Las distancias genéticas entre individuos fueron calculadas según el coeficiente de Dice (1945) o Nei-Li (1979), con el programa NTSYS-PC V. 2.1 (Rohlf, 2000).

$$D = 2a / (2a + b + c)$$

Donde:

a= numero de bandas presentes en ambos individuos i y j.

b= numero de bandas presentes en i pero ausentes en j

c= numero de bandas presentes en j pero ausentes en i.

A partir de la matriz de distancias calculada, se construyó un dendrograma (método UPGMA) con el programa NTSYS pc v. 2.1. (Rohlf, 2000). Un análisis bidimensional de coordenadas principales fue construido para proporcionar otro medio para observar las relaciones entre accesiones mediante el programa EIGEN (NTSYS) y graficado a través del programa Microsoft® Excel.

3.3.2. Análisis de la estructura de población La estructura genética de la colección referencia de silvestres fue analizada mediante el programa STRUCTURE (Falush et al., 2005; Pritchard et al. 2000). Este programa plantea subdividir la muestra en poblaciones en las que se logre el equilibrio de Hardy-Weinberg y se disminuya el desequilibrio de ligamiento. El primer parámetro no tiene aplicación en una muestra de líneas puras de una especie autógama, pero el segundo es absolutamente aplicable. Se trata de un nuevo algoritmo de análisis de clúster, basado en criterios de genética de poblaciones, y con la ventaja de que ofrece resultados con un cierto grado de objetividad, por lo que la agrupación final no depende sólo del criterio del investigador.

El numero de poblaciones (K) fue confirmado mediante un análisis bayesiano de Monte Carlo con cadenas Markov (MCMC), implementado en el programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003), empleando la opción de “modelo de ligamiento”. Este método permite clasificar los genotipos en

poblaciones, mediante el procedimiento de minimizar el desequilibrio de ligamiento dentro de las mismas.

Se hicieron 15 ejecuciones del programa, proporcionando cada vez un número distinto de poblaciones (K), de 2 a 10. Para cada ejecución del programa tanto el número de repeticiones de entrenamiento como el de repeticiones MCMC fue de 50.000. El número de poblaciones más probable se decide según el valor del 'loglikelihood'. Un gráfico en barra de coeficientes de asociación fue generado usando el programa DISTRUCT (Rosenberg 2004)

3.3.3. Análisis de diversidad genética Mediante el programa PowerMarker (Liu, 2003), se evaluó el número de alelos polimórficos, Contenido de Información Polimórfica (PIC), Heterocigosidad Observada y Diversidad Genética.

El Contenido de Información Polimórfica fue calculado según Botstein et al. (1980) así:

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

Donde:

P_i=Frecuencia del i-ésimo alelo
P_j=Frecuencia del j-ésimo alelo
K=número de alelos

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

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

Donde:

f= Coeficiente de endogamia
i= alelos en el locus l
l= l-ésimo locus
P_i=frecuencia del alelo i en el l-ésimo locus de la población
n=número de individuos muestreados

3.3.4. Análisis molecular de varianza Se realizó un análisis molecular de varianza para comparar entre y dentro de poblaciones establecidas por NTSYS, y corroboradas por STRUCTURE, mediante el programa AMOVA (Programa Arlequín versión 3.1, Excoffier et al., 2005).

El análisis se realizó basándose sobre el modelo de alelos infinitos que explica la evolución del polimorfismo de los microsatélites.

El modelo llamado modelo de alelos infinitos (IAM) considera que el cambio en el tamaño de los alelos puede ocurrir a saltos grandes o pequeños, con la misma probabilidad. El índice de fijación estadístico F_{ST} (Wright, 1951) calculado de acuerdo con este modelo, refleja diferencias que existen entre clases de alelos sin tener en cuenta la amplitud del tamaño real de la diferencia. El índice F_{ST} se define como:

$$F_{ST} = \frac{\sigma^2 a}{\sigma^2 T}$$

donde $\sigma^2 a$ y $\sigma^2 T$ se calculan a partir de la tabla del AMOVA (Tabla 9)

Tabla 9. Esquema del análisis molecular de varianza.

Fuente de variación	Grados de libertad*	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio esperado**
Entre grupos	P-1	Entre grupos	$n\sigma^2_a + \sigma^2_b$
Dentro de grupos	N-P	Dentro de grupos	σ^2_b
Total	N-1	Total	σ^2_T

*P: número total de grupos analizados

*N: número total de individuos

$$** \eta = \frac{N - \sum_P \frac{N_p^2}{N}}{P-1}$$

3.4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES

Se utilizaron los datos de pasaporte reportados por Thome et al. (1996) de país de origen, altitud, habito de crecimiento, estado biológico, tipo de faseolina y tamaño

de semilla. Adicionalmente, el color de semilla de estos materiales fue suministrado por la Unidad de Recursos Genéticos – CIAT, a través de la consulta de su página Web www.ciat.cgiar.org. También, en el estudio de Chacón et al. (2007) se consideró el tipo de haplotipo de Cloroplasto analizado para varias de las accesiones estudiadas en el presente trabajo (Anexo C). Todo lo anterior, con el fin de correlacionar estos datos con las agrupaciones generadas por el análisis de coordenadas principales (PCoA).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DIVERSIDAD ALÉLICA

4.1.1. Polimorfismo alélico En la colección núcleo de silvestres fueron identificados un total de 492 alelos utilizando 36 marcadores microsatélite fluorescentes, con un promedio de 13.30 alelos por marcador, y un promedio de PIC (del inglés, *Polymorphic Information Content*) de 0.64 (Tabla 10).

Lo anterior es alto si se compara con estudios con microsatélites detectados mediante la técnica de tinción con plata, donde Díaz y Blair (2005) identificaron 270 alelos con promedio por marcador de 5.1 alelos en la estructura de raza del acervo mesoamericano; Blair et al. (2006) reportó un promedio de 7.8 alelos por marcador y un promedio de PIC de 0.53 en un panel de 44 genotipos utilizando 129 marcadores microsatélites, y a su vez Zhang et al. (2008) identificó la prevalencia de los acervos Andino y Mesoamérica en 229 genotipos de frijol común de origen chino analizados a través de 30 marcadores microsatélites, obteniendo un total de 166 alelos y un PIC de 0.54.

Por consiguiente, el alto número de alelos y PIC encontrados en este estudio, demuestra que los marcadores microsatélite analizados mediante fluorescencia en ABI 3770 son una poderosa herramienta que incrementa considerablemente la sensibilidad, precisión y resolución en el momento de detectar polimorfismo de hasta un solo par de bases, de ahí que estudios realizados con esta técnica aporten valiosa información en la definición de la estructura y diversidad genética del *Phaseolus vulgaris*.

Por lo antes mencionado, así fue para Kwak y Gepts (2009) identificando 421 alelos en una colección de 349 accesiones entre silvestres y domesticadas; González (2008) encontrando 301 alelos con un promedio de 7.8 alelos por marcador en la evaluación de una colección de germoplasma de frijol común de Ruanda (África); y también Moreno (2007), obteniendo 421 alelos en 221 variedades comerciales de frijol común de África con un promedio de PIC de 0.51.

La amplificación con 36 marcadores microsatélites en 108 accesiones silvestres dio como resultado un éxito de amplificación (aviabilidad) del 95% y un 5% de no amplificados interpretándose para este estudio como datos perdidos. La no amplificación de alelos puede deberse a problemas en las condiciones de amplificación o a la ausencia del alelo, este último es llamado alelo nulo y se origina posiblemente por mutaciones puntuales, inserciones o deleciones en el sitio de unión del primer dificultando la amplificación por PCR de las regiones microsatélites. Si la mutación no es fija en la población solamente una fracción de todos los alelos amplificaran (Grisi et al., 2007, Varshney et al., 2005)

Tabla 10. Diversidad genética de 104 accesiones silvestres y cuatro controles de diversidad, analizada con 36 marcadores fluorescentes (19 genómicos y 17 génicos).

GENOMICOS					
Marcador	No. Alelos	A*	He**	Ho+	PIC++
AG01	7	0.97	0.70	0.02	0.66
BM137	12	1.00	0.30	0.02	0.30
BM139	15	0.90	0.74	0.00	0.70
BM140	20	0.84	0.81	0.09	0.80
BM141	22	0.98	0.87	0.13	0.85
BM143	22	0.97	0.93	0.11	0.93
BM149	6	1.00	0.36	0.09	0.34
BM156	26	0.90	0.88	0.17	0.87
BM160	17	0.90	0.85	0.02	0.83
BM172	17	0.99	0.78	0.04	0.75
BM175	21	1.00	0.92	0.12	0.91
BM183	17	0.89	0.89	0.18	0.88
BM187	25	0.84	0.90	0.15	0.89
BM188-A	8	0.98	0.60	0.09	0.56
BM188-B	20	0.89	0.92	0.00	0.92
BM200	22	1.00	0.92	0.12	0.91
BM201	16	0.91	0.68	0.39	0.67
BM205	13	1.00	0.81	0.12	0.79
GATs54	14	0.97	0.61	0.05	0.59
GATs91	24	0.99	0.94	0.16	0.94
Promedio	17.2	0.95	0.77	0.10	0.75
GENICOS					
Marcador	No. Alelos	A*	He**	Ho+	PIC++
BMd01	17	0.88	0.91	0.31	0.91
BMd02	5	0.93	0.46	0.08	0.43
BMd08	7	1.00	0.56	0.06	0.53
BMd15	9	0.99	0.37	0.16	0.35
BMd16	4	0.96	0.50	0.01	0.39
BMd17	6	0.99	0.35	0.01	0.33
BMd18	7	0.93	0.80	0.09	0.77
BMd20	7	0.98	0.63	0.05	0.59
BMd46	5	0.98	0.59	0.05	0.50
BMd47	5	1.00	0.49	0.02	0.41
BMd51	1	0.86	0.00	0.00	0.00
BMd56	3	0.99	0.49	0.02	0.42
PV-AG003	6	0.96	0.46	0.01	0.43
PV-AT001	40	0.94	0.96	0.09	0.96
PV-AT003	9	0.94	0.63	0.11	0.58
PV-CCT001	5	1.00	0.40	0.10	0.36
PV-CTT001	12	1.00	0.82	0.15	0.80
Promedio	8.71	0.96	0.55	0.08	0.51
Total	492				

Rojo : Marcadores con mayor número de alelos

Verde : Marcadores con alta diversidad genética

Azul : Marcadores con mayor Heterocigosidad observada

Naranja : Marcadores con alto PIC

*A: Aviabilidad; ** He: Heterocigosidad esperada; +Ho: Heterocigosidad observada; ++ PIC: Contenido de Información Polimórfica

Todos los marcadores fueron polimórficos, con excepción del marcador BMd51, el cual ha sido reportado previamente por Chávez (2007) como monomórfico. En contraste, sobresale el marcador génico PV-AT001 con 40 alelos e índice de heterocigosidad esperada de 0.96, en Blair et al. (2006) este marcador fue muy informativo; y los genómicos BM156, BM187 y GATs91 con 26, 25 y 24 alelos, respectivamente e índices de heterocigosidad esperada mayores a 0.88. Según el PIC el marcador génico PV-AT001, y los genómicos GATs91 y BM143 proporcionaron valores mayores a 0.93.

El marcador génico BM201 y el genómico BMd01, presentaron un alto índice de individuos heterocigotos (0.39 y 0.31, respectivamente) en comparación a los demás marcadores que presentan una heterocigosidad observada menor a 0.17. Mientras tanto en la población de estudio la heterocigosidad en promedio se situó por debajo del 9%, esto siendo concordante con el estado de plantas autogamas en las que no se han realizado selección debido a que la autofecundación generación tras generación, produce un aumento del número de homocigóticos, frente a una disminución del número de heterocigóticos.

De los 36 marcadores microsatélites analizados, 35 amplificaron un solo locus, y el marcador BM188 presentó dos regiones bien diferenciadas, por ello los loci fueron separados según sus pesos moleculares: BM188A para el locus de menor tamaño (144-158 pb) y BM188B para el de mayor tamaño (160-198 pb), ambos locus presentan fragmentos de muy buena señal. Lo anterior ha sido reportado en otros estudios de diversidad de *Phaseolus vulgaris* L., como González (2008), Moreno (2007) y Chávez (2007).

Las duplicaciones de regiones en cromosomas son frecuentes y parecen ser un importante mecanismo de la evolución del genoma, estas pueden originarse a partir de eventos de entrecruzamiento (Crossing over) desigual durante la meiosis, conversión de genes y transposición duplicativa (Ohta, 1986, Frisch et al., 2004).

Entre los microsatélites analizados, los marcadores genómicos presentaron un alto promedio de alelos (17.2), mayor heterocigosidad esperada (0.77) y máximo PIC (0.75), con respecto a los microsatélites basados en ADNc con promedio de alelos de 8.71, índice de heterocigosidad esperada de 0.55 y PIC de 0.51. Por lo anterior, los microsatélites basados en secuencias no codificantes pueden albergar mayor cantidad de mutaciones que pueden agregar o sustraer lentamente unidades repetitivas a un arreglo microsatélite en particular sin afectar o comprometer la supervivencia del organismo, caso contrario a los microsatélites diseñados a partir de secuencias codificantes en donde una mutación puede afectar drásticamente la viabilidad de los organismos portadores de esta (Oliveira et al., 2006).

En la figura 8, se observa el comportamiento del PIC y el número de alelos entre marcadores microsatélites genómicos y génicos, lo cual refleja en los génicos una agrupación heterogénea que fluctúa a través de cada marcador, en cambio en los

genómicos esta conformación es homogénea debido a que la mayoría de los marcadores presentan un PIC y un número de alelos generalmente similares.

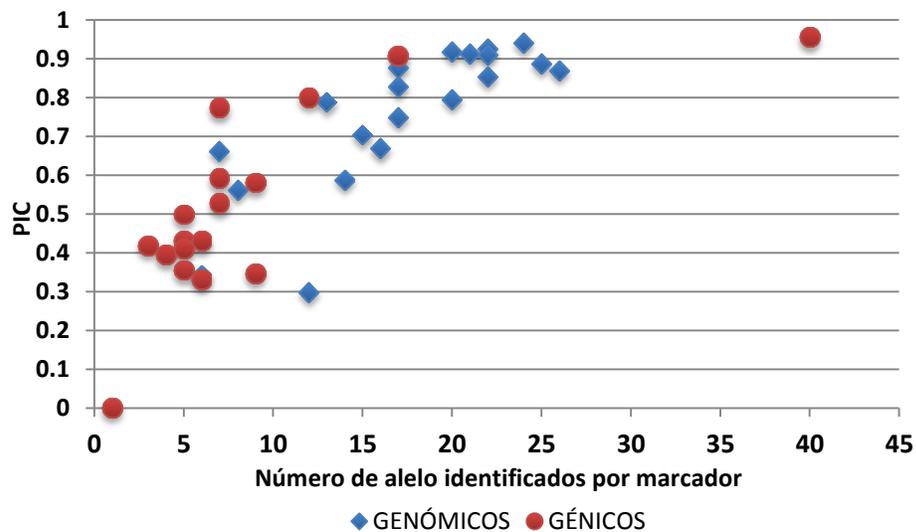


Figura 8. Relación entre Contenido de información polimórfica (PIC) de cada microsatélite y el número de bandas alélicas identificadas por 19 microsatélites genómicos y 17 génicos.

4.2. ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO

A partir del análisis de agrupaciones de UPGMA basado en el coeficiente de DICE (1945) se obtuvo rangos de similitud de 0.17 a 0.86 (17% a 86%) (Figura 9). El coeficiente de DICE (1979), según Laurentin (2009) muestra buenos resultados en análisis con marcadores codominantes ya que es menos sesgado que los resultados obtenidos por otros coeficientes como Jaccard, que da importancia tanto a la presencia y ausencia de bandas entre dos individuos, caso contrario, al Coeficiente de DICE que da doble importancia a los datos presentes en dos individuos.

A un nivel de similitud del 54% se pueden distinguir seis clúster bien definidos, los cuales se determinaron como los acervos Mesoamericano y Andino, además de la presencia de otros centros menores como Guatemala, Ecuador-Norte del Perú y Colombia. También se observa diez accesiones que no lograron formar grupos, en donde tenemos las accesiones silvestres G24345, G24391, G12889, G12893, G24605, G24576 y G23511 de origen Mexicano, la maleza (weedy) G24665 de origen colombiano, y los cultivados G4494 y G19833, para efectos de caracterizar este grupo de accesiones se determinó como Grupo de accesiones no definidas (Anexo D).

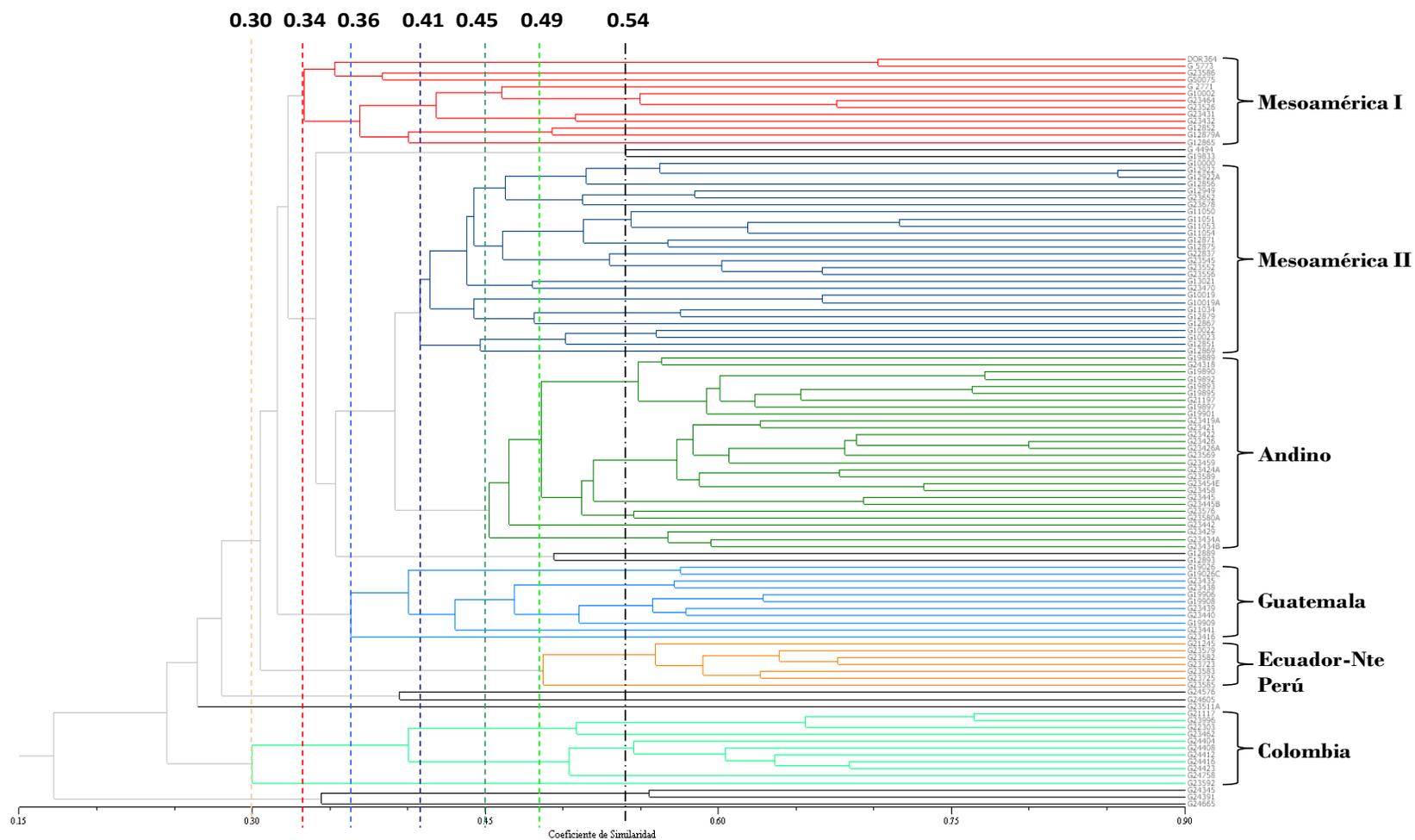


Figura 9. Dendrograma de similitud genética en accesiones de la colección núcleo de *P. vulgaris* silvestres, dibujado por UPGMA mediante el estimado de Nei –Li (DICE) basados en marcadores microsatélites fluorescentes. En líneas de color negro accesiones que no formaron grupo.

- *Clúster I.* Conformado por trece accesiones silvestres presentan un nivel de similaridad del 34% con respecto a las demás agrupaciones. Este grupo se identificó como Mesoamérica I por la ubicación y agrupamiento de las cultivares DOR364 y G5773, siendo ambos controles cultivados de diversidad para el acervo Mesoamericano como ha sido reportado por Blair et al. (2006) y Díaz y Blair (2005). La mayoría de las accesiones de este grupo se colectaron en México, con excepción de las accesiones G12852 originaria de El Salvador y G23586 de Perú. Es de notar que la accesión G23586, catalogada como maleza, proveniente de la provincia de Cajamarca al norte del Perú posiblemente es el resultado de la introgresión con cultivares de origen mesoamericano, las cuales son comunes en provincias de Junín y Cajamarca (Tohme et al., 1996).
- *Clúster II.* Denominado Mesoamérica II, se asociaron un total de veintiocho accesiones que en su mayoría fueron colectadas en México, y en menor cuantía en Guatemala. Sorpresivamente, en este clúster se asoció la accesión de origen peruano G12856. Este grupo presenta una similaridad con respecto a los demás del 41%.
- *Clúster III.* Se encuentra compuesto de veintiocho accesiones en las cuales existen características propias del acervo Andino. Se reporta la presencia de la accesión G23580A de Ecuador reportada como maleza (weedy) con faseolina típica del grupo Ecuador-Norte del Perú, lo que confirma la teoría de los eventos de introgresión entre acervos. El nivel de similaridad de este grupo con respecto a otros se representa en un 45%. En el acervo Andino se presenta un caso particular con las accesiones de origen Argentino que presentan una cerrada agrupación con respecto a las demás accesiones que componen este acervo, mostrando un aislamiento de otros germoplasmas de frijol y por ende la no introgresión de accesiones de otras regiones, posiblemente este centro genético no participó en la domesticación de los cultivados andinos (Debouck et al., 1993, Santalla et al., 2004).
- *Clúster IV.* Con once accesiones agrupadas se encontró, conformado en su gran mayoría por 8 accesiones provenientes de Guatemala, y una de cada una de México y Costa Rica. Por estas razones a este grupo se le denominó Guatemala, además de presentar un nivel de similaridad entre grupos del 36%. Beebe et al., 2000 sugiere a Guatemala por sus tierras altas una eco-región aislada donde se pudieron haber dado eventos evolutivos de distintas poblaciones de tanto frijoles domesticados como silvestres.
- *Clúster V.* Consiste en siete accesiones provenientes del Sur de Ecuador y del Norte del Perú con un nivel de similaridad del 49%, este grupo previamente se había identificado como el presunto ancestro de la población de *P. vulgaris* basados en la presencia de los genes para un tipo de faseolina ancestral, además

de mostrar una baja diversidad genética que otras poblaciones silvestres (Debouck et al., 1993; Kami et al., 1995; Tohme et al., 1996; Kwak y Gepts, 2009).

- *Clúster VI.* Las accesiones silvestres Colombianas se agruparon con un nivel de similaridad del 30%. Colombia por su ubicación geográfica presenta entrecruzamiento e intercambio genético entre acervos (Tohme et al., 1996). Como caso aparte, tenemos la accesión G23592 originaria de México e introducida en territorio Argentino, y posteriormente colectada y caracterizada erróneamente (Comunicación personal M. Duque, 2008). Las poblaciones silvestres Colombianas pudieron haber compartido un ancestro común con poblaciones Mesoamericanas, en donde hubo un proceso de divergencia producto de cambios geográficos, como el cierre del istmo de Panamá y el levantamiento de los Andes, influenciando eventos de diferenciación intra-específica (Chacon et al., 2005).

4.3. ESTRUCTURA GENÉTICA

Este análisis clasificó las 108 accesiones en diferentes poblaciones o clúster de individuos próximos genéticamente minimizando el desequilibrio de ligamiento dentro de los clústeres (Figura 10).

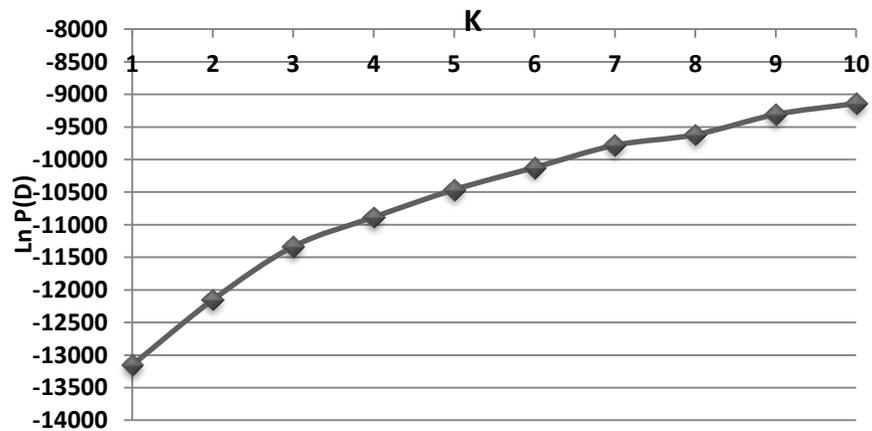


Figura 10. Evolución del valor del '*log-likelihood*' (LnP D) en función del número K de poblaciones (promedio de 25 repeticiones del análisis para cada valor de K).

El K=5 se eligió según el valor del '*log-likelihood*'. En nuestro caso, el punto de inflexión descrito por Falush *et al.* (2003), producido por la curva de los distintos valores del '*log-likelihood*' en función de los valores de K, no se manifestó claramente. Sin embargo se observó que el aumento en probabilidad para las poblaciones obtenidas cada vez que se ejecutaba el programa eran estables hasta K=5. Esto apoya las asociaciones generadas con características propias de estas poblaciones y se asemejan a las generadas por el dendrograma de similaridad.

Sin embargo a un K=6 no se observó subdivisión del grupo Mesoamericano, como se visualizó en el análisis del dendrograma.

Al dividir las 108 accesiones en un K=2 hasta K=5 se obtiene la figura 11.

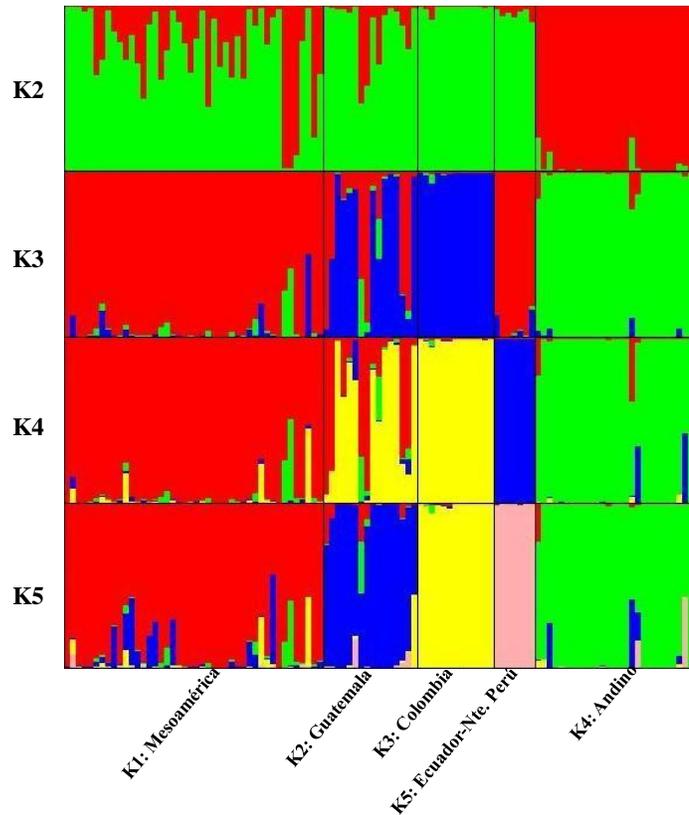


Figura 11. Gráfica de estructura de la población (K=2 a K=5) para 104 accesiones silvestres y 4 cultivadas. Nombres de grupos/clúster indicados bajo la figura.

La estructura poblacional determinada por STRUCTURE y el dendrograma basado en distancia genética mostraron una significativa divergencia entre los acervos Mesoamericano y Andino, al igual que la subdivisión de poblaciones discretas como Guatemala, Colombia y Ecuador-Norte del Perú.

A un K=2 las 108 accesiones se separaron en Mesoamérica (color verde) y Andino (color rojo). La siguiente división (K=3) sucedió dentro del acervo Mesoamérica (color rojo), en donde se determinaron accesiones de origen Guatemala y Colombia (color azul). En la tercera etapa (K=4), se separaron del acervo Mesoamérica (color rojo) las accesiones pertenecientes a Ecuador-Norte del Perú (color azul), y por último a un K=5 se separaron las accesiones del grupo Guatemala (color azul) de las del grupo Colombia (color amarillo).

Entre las asociaciones de individuos presentadas en el dendrograma comparadas con las generadas por STRUCTURE tenemos una coincidencia del 87,04 %, sin embargo nuestros análisis permitieron constatar la conformación de los grupos Mesoamérica, Guatemala, Colombia, Andino y Ecuador-Norte del Perú (Figura 12). Las 108 accesiones se repartieron en las 5 poblaciones (K=5) de la siguiente forma:

- *Población 1:* contiene 44 accesiones, de las cuales 40 se agruparon en el análisis de similaridad genética entre Mesoamérica I y II. Se observa un comportamiento inusual en algunos individuos que en el análisis de similaridad conformaban otros grupos o simplemente eran atípicos a estas conformaciones, como son los casos de las accesiones Mexicanas G12889, G12833 y G23511A las cuales se asociaron a esta población, caso especial sucedió con la accesión Argentina G23592 que en el anterior análisis se agrupó con accesiones de origen Colombiano; y la accesión Mexicana G50075 que dejó de pertenecer a Mesoamérica para asociarse con accesiones Guatemaltecas.
- *Población 2:* reúne 16 accesiones, se mantienen las 11 accesiones que anteriormente se había denominado como grupo Guatemala, y aparecen asociados otros individuos como las accesiones atípicas de origen Mexicano G24576 y G24605, la anteriormente mencionada accesión G50075, y las accesiones Guatemaltecas G23434A y G23434B, anteriormente agrupadas en el grupo Andino.
- *Población 3:* agrupa 13 accesiones, en donde aparecen tres nuevas accesiones que no conformaban grupo alguno, las accesiones Mexicanas G24345 y G34391, y la Colombiana G24665. En términos generales se sigue manteniendo la misma estructura ya descrita en el Grupo Colombia, con excepción de la separación de la accesión Argentina G23592.
- *Población 4:* en esta población no se produjo ningún cambio en su conformación ya que se mantuvieron asociadas las mismas 7 accesiones que pertenecen al Grupo Ecuador-Norte del Perú.
- *Población 5:* contiene 26 accesiones de las previamente descritas en el Grupo Andino, además de la inclusión de dos cultivares, G19833 y G4494, controles de diversidad del Acervo Andino. También se produjo la salida de dos accesiones Guatemaltecas mencionadas en la población 2.

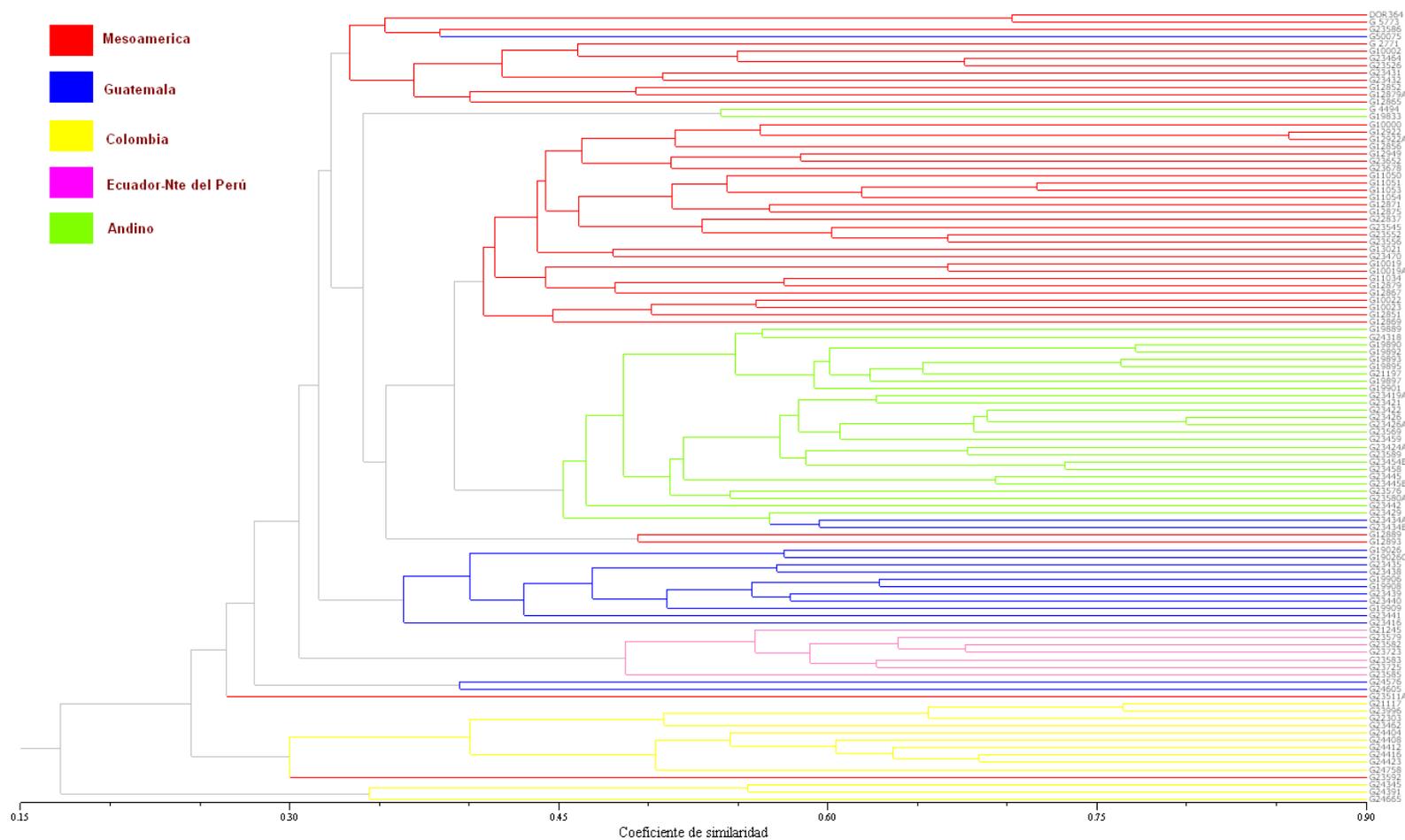


Figura 12. Dendrograma de agrupamiento por estructura de población generados a partir del programa STRUCTURE usando el método UPGMA mediante el estimado de Nei –Li (DICE) basados en marcadores microsatélites.

La estructura anteriormente planteada por STRUCTURE, en términos generales, es igual a la generada por análisis de similaridad, en particular la subdivisión entre acervos Mesoamérica y Andino, y la diferenciación del grupo ancestral Ecuador-Norte del Perú, y los centros de Guatemala y Colombia. Por esto es consistente con los esquemas jerárquicos de acervos y centros menores encontrados en otros trabajos (Thome et al., 1996, Chacón et al., 2005, Chacón et al., 2007), además con el estudio de estructura de la diversidad genética en cultivados y silvestres de Kwak y Gepts (2009) donde encontró que el grupo de silvestres de Ecuador-Norte del Perú está asociado con el acervo Mesoamericano, al igual con lo encontrado en nuestro estudio a un $K=2$.

La teoría de una asociación Mesoamericana con el grupo ancestral de Ecuador-Norte del Perú es más congruente con lo reportado por Chacón et al. (2005) basándose en el polimorfismo de haplotipo de cloroplasto donde teoriza una posible evolución de algunas poblaciones de frijol silvestre Mesoamericano a partir de la población ancestral.

Es de notar que las accesiones silvestres de Colombia y Guatemala presentan una significativa relación, cuando el número de poblaciones es $K=3$ a $K=4$ similar a lo reportado por Koenig et al. (1990), en donde encontraron individuos de origen colombiano presentando faseolina tipo CH, al igual que en frijoles silvestres de Guatemala, sugiriendo un flujo genético con el acervo Mesoamericano, especialmente con esa zona.

4.4. ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES (PCoA)

Este análisis permite ilustrar mejor los ejes principales de variabilidad entre las accesiones, reflejando su ordenación en el espacio (Figura 13). Las dos primeras coordenadas resultantes de éste análisis explicaron el porcentaje de la totalidad de la diversidad genética (51.38%). El eje 1 explicó el 30.79% de la variabilidad y el eje 2, explicó el 20.59% de la variabilidad.

De acuerdo al análisis de coordenadas principales se obtuvo una separación, de las accesiones silvestres estudiadas, en dos grandes grupos, correspondiendo a los acervos Mesoamericano y Andino, esto siendo posible a la separación de los controles de diversidad que se utilizaron en el estudio. En la figura 13, se observan los controles DOR364 y G5773 para el acervo Mesoamericano, y los controles G19833 y G4494 del acervo Andino. Sin embargo, estos controles no comparten un espacio cercano a las accesiones silvestres, posiblemente por ser cultivares obtenidas a partir de diferentes cruces o procesos de introgresión. Por ende estos controles parecen ser más útiles solo para accesiones domesticadas como en los estudios de Blair et al. (2006); y Díaz y Blair (2006) donde fueron eficientes en la determinación de los dos principales acervos genéticos.

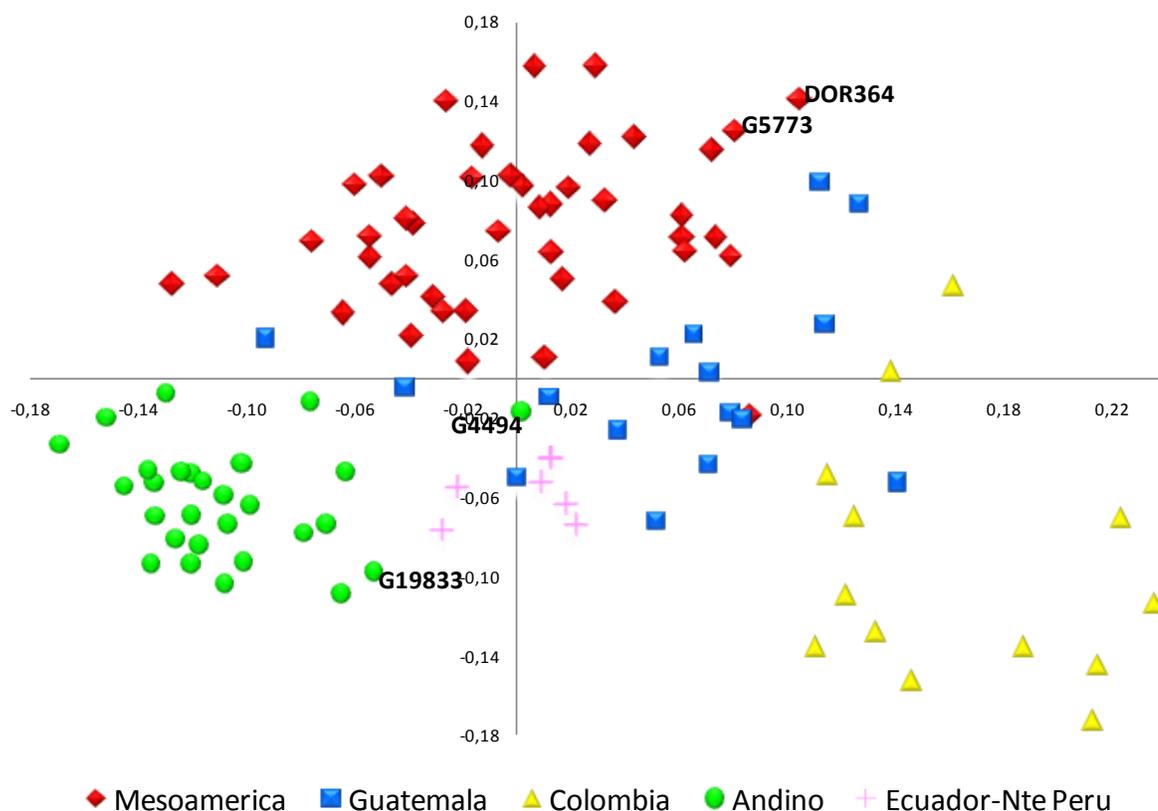


Figura 13. Representación grafica en dos dimensiones de la distribución y ubicación espacial de los genotipos silvestres a partir el Análisis de coordenadas Principales (PCoA). Colores de acuerdo a agrupamientos generados por STRUCTURE.

4.5. IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS GENERADOS EN STRUCTURE

A continuación se detalla algunas características encontradas en cada uno de los grupos generados en STRUCTURE, como son rango altitudinal, país de origen, tamaño y color de semilla, tipo de faseolina y haplotipo de cloroplasto.

- *Mesoamérica.* Las accesiones pertenecientes a este grupo presentan un rango altitudinal entre 800 y 2100 msnm. Estas accesiones en un 88.10% provienen de México, seguido de un 4.76% de Perú y un 2.38%, cada uno, de Argentina, El Salvador y Guatemala. Específicamente las accesión G12856 y G23586 de Perú provee evidencia de eventos de hibridación entre el acervo Mesoamericano y el Andino.

Generalmente la semilla de estas es de tamaño pequeña y de color crema, con algunas excepciones de color amarillo, café y negro (Figura 14). En cuanto a faseolina existe una alta proporción del tipo M (83.33%) y del S (11.90%) y muy

pequeña del T y J (2.38%, cada una). Tanto la faseolina M como la S han sido encontradas en formas silvestres y cultivadas de *Phaseolus vulgaris* siendo características del acervo Mesoamericano (Gepts, 1988).

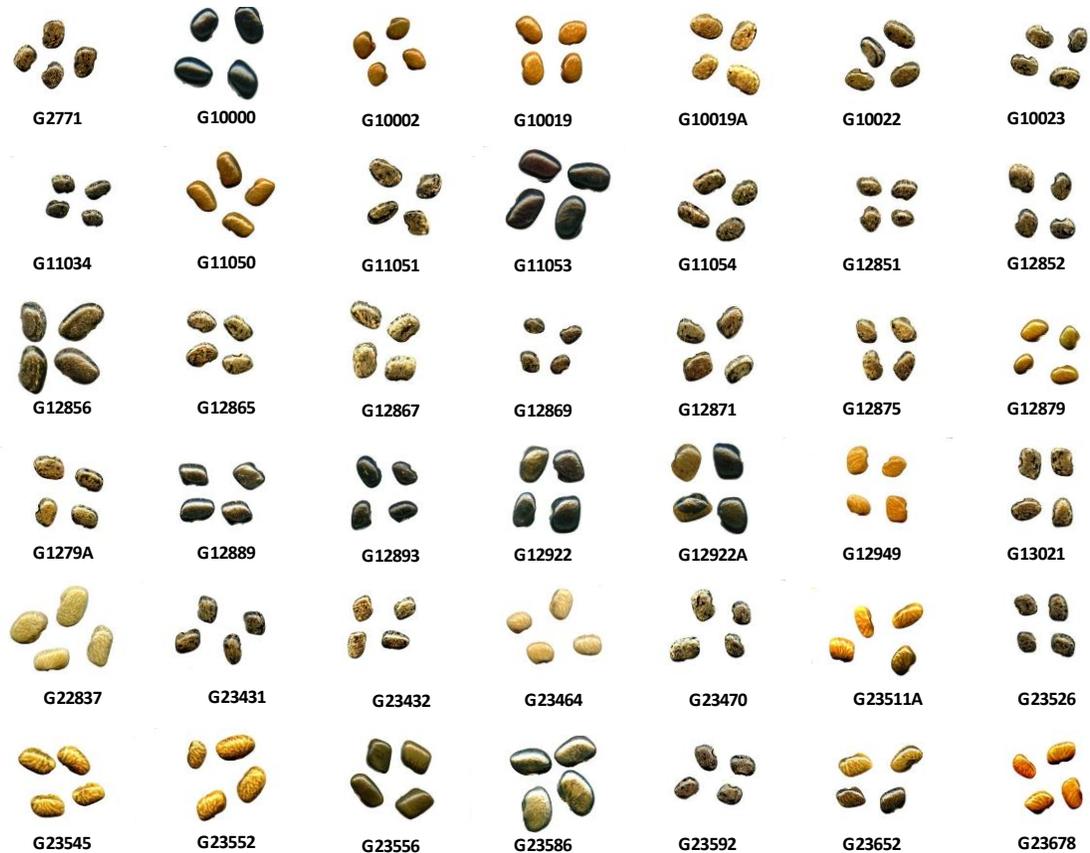


Figura 14. Semilla de accesiones pertenecientes al Acervo Mesoamericano.

En haplotipo de cloroplasto se presentan las formas B (10.71%), J (10.71%), K (14.29%) y N (3.57%), que según Chacon et al. (2005) son restrictivas para este acervo, y también se encuentran las formas A (32.14%), G (7.14%) y L (21.43%), que según los mismos autores se encuentran tanto en el acervo Andino como en el Mesoamericano.

- *Guatemala.* En su gran mayoría lo componen accesiones provenientes de Guatemala (62.50%), de los estados del sur de México (Chiapas, Oaxaca y Jalisco) con un 31.5% y de Costa Rica (6.25%), en un rango altitudinal entre 1030 y 1960 msnm.

La semilla es pequeña de color café y negra, con otros tipo de colores (Figura 15). La faseolina que mas abunda en estas son los tipos M (53.33%) y CH (40.00%), y una pequeña proporción del tipo S (6.67%). Este grupo mostró una interesante

diversidad distinta al germoplasma Mexicano por lo que sugeriría a Guatemala como una zona geográfica con condiciones únicas que ha desarrollado un papel esencial en la evolución del *Phaseolus vulgaris*. Se observa en este acervo un alto porcentaje de haplotipo de cloroplasto de la forma I con un 53.33%, seguido de G (20%), J (13.33%), A y H (6.67%, cada uno).

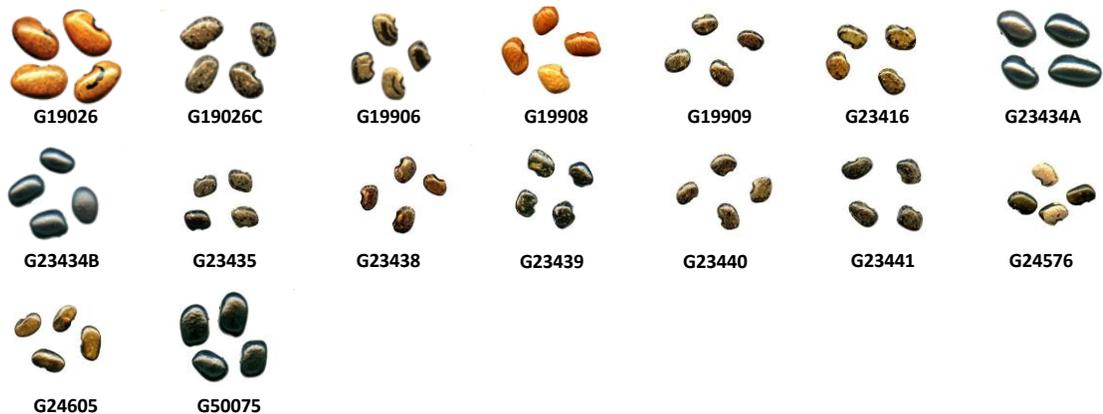


Figura 15. Semilla de accesiones pertenecientes al centro menor Guatemala.

- *Colombia.* En un 84.62% las accesiones que conforman este centro menor son de origen Colombiano y un 15.38% Mexicano, estas se encuentran en un rango altitudinal entre 1240 y 1970 msnm. La semilla es pequeña de color crema y negro (Figura 16), con una variedad de faseolina entre las que encontramos el tipo B (38.46%), CH (23.08%), H y M (15.38%, cada una), y T (7.69%). Lo encontrado, reafirma la teoría que Colombia es un corredor geográfico de confluencia entre los principales acervos debido a la presencia de faseolina T típica del acervo Andino, y faseolina M del acervo Mesoamérica. Además, se observa que algunas accesiones presentan faseolina CH la que también ha sido encontrada en accesiones de Guatemala.

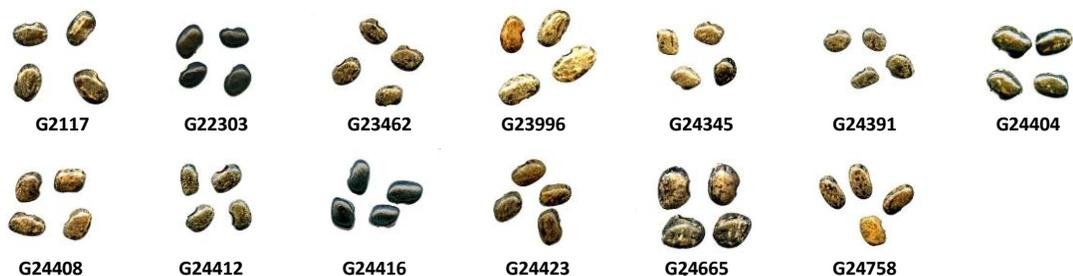


Figura 16. Semilla de accesiones pertenecientes al centro menor Colombia.

En haplotipo de cloroplasto en este grupo abunda la forma L (81.82%) seguido de A e I (9.09%, cada uno). Lo anterior demuestra que las accesiones de este grupo

presenta una estrecha relación con el acervo Mesoamericano y con el Centro menor Guatemala.

- *Ecuador-Norte del Perú.* Se colectaron en un rango altitudinal entre 920 y 1990 msnm, en el sur de Ecuador y el Norte de Perú. El tipo de semilla es pequeño y de color crema (Figura 17), con faseolina enteramente de tipo I. Sumado a este hecho, se registró dos tipos de haplotipo de cloroplasto E (28.54%) y F (71.43%), solo reportados en accesiones silvestres y malezas (weedy) originarias de Ecuador y Perú (Chacón et al., 2005).



Figura 17. Semilla de accesiones pertenecientes al Centro menor Ecuador-Norte del Perú.

- *Andino.* Estas accesiones se colectaron en un rango altitudinal entre 1200 y 2940 msnm, en los países de Perú (46.15%), Argentina (34.64%), Bolivia (11.54%), y Ecuador y sorpresivamente México (3.85%, cada uno). Su semilla es generalmente pequeña con algunas malezas (weedy) con semilla grande, y variados colores entre crema, amarillo y café (Figura 18). Predomina la faseolina tipo T (53.85%), seguido por el tipo H (19.23%), J (7,69%) y P (7,69%), sin embargo se reporta la presencia de faseolina Mesoamericana del tipo M y CH con una representación cada una del 3.85%, lo que demuestra la frecuencia de introgresión en este acervo.

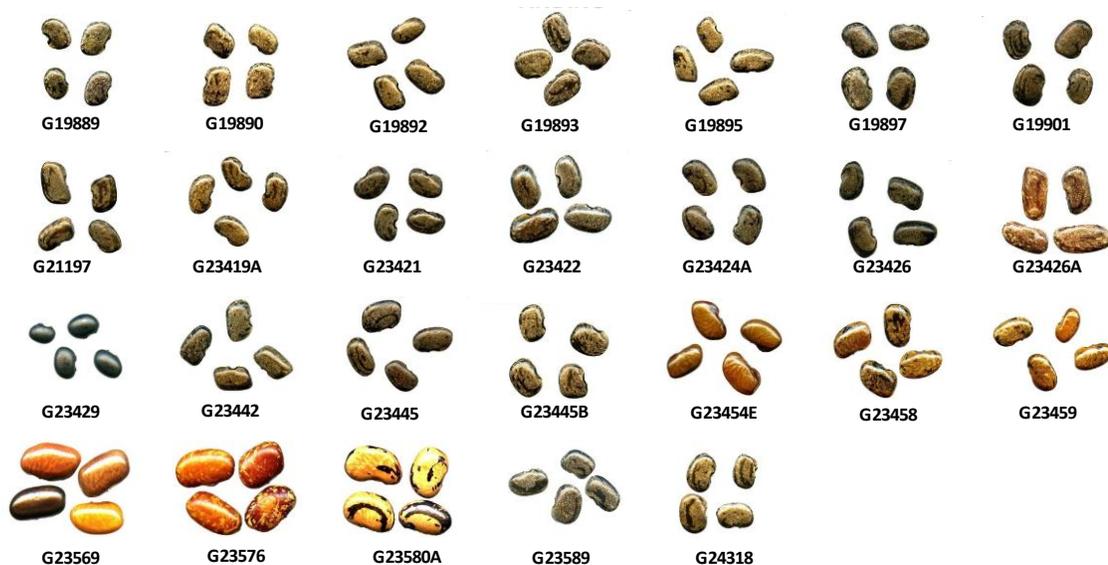


Figura 18. Semilla de accesiones pertenecientes al Acervo Andino.

Se encontró en haplotipo de cloroplasto un 17.39% del A, 43.48% del C, 34.78% del D, y curiosamente K con una representación del 4.35% correspondiendo a la accesión G23429 colectada en México.

En general, en la colección referencia de silvestres se observa un alto porcentaje de accesiones provenientes de México con un 43.3%, seguido con un 16.3% de accesiones provenientes del Perú; Guatemala y Colombia cada una con un 10.6%, Argentina con un 9.6%, Ecuador con 4.8%, y en menor medida con una representación del 2.9% de Bolivia, y Costa Rica y El Salvador cada uno con el 1.0% (Figura 19). Como se observa existe una gran influencia del origen geográfico en la agrupación de las accesiones por medio de marcadores microsatélites.

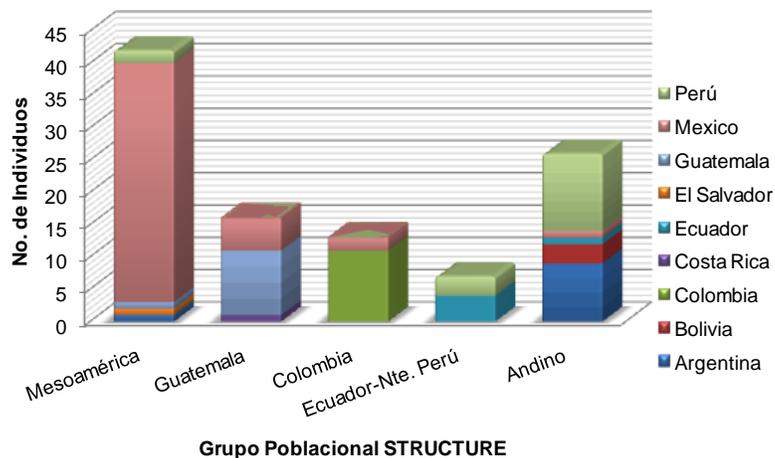


Figura 19. Representación de países de origen por cada grupo poblacional encontrado basado en STRUCTURE.

Según el tipo de faseolina encontrado en cada accesión, se encontró un total de nueve patrones diferentes en los cuales se tiene un alto porcentaje del tipo M (44.7%) y del tipo T con un 15.5%, y en una menor frecuencia de las faseolinas B (4.9%), CH (9.7%), H (6.8%), I (7.8%), J (2.9%), P (1.9%) y S (5.8%) (Figura 20). En diferentes estudios de diversidad como Gepts y Bliss (1986), Gepts (1988), y Koenig y Gepts (1989) usando faseolinas como marcadores se determinó que el tipo de faseolina M es característico del acervo Mesoamericano y el tipo T del acervo Andino, y además Koenig et al. (1990) identificó un tipo característico del Norte del Perú denominada faseolina I.

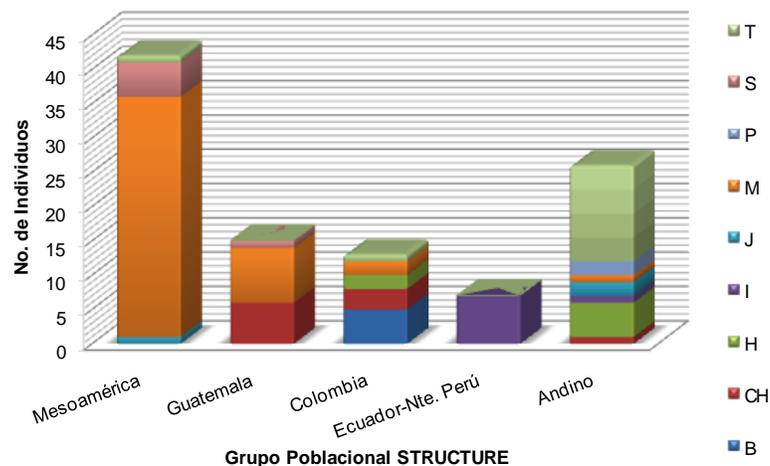


Figura 20. Distribución de patrón de faseolina dentro de cada grupo poblacional basado en STRUCTURE.

En la colección referencia de silvestres de frijol común se observa una variedad de haplotipo de cloroplasto sobresaliendo los haplotipo A y L cada uno con un 17.9% de presencia en las accesiones de la colección, seguidos por C, D e I con un 11.9%, 9.5% y 10.7% respectivamente. Con una baja representación del 6.0% cada uno de F, G, J y K, y de B (3.6%), E (2.4%), H y N (1.2% cada uno). Según Chacón et al. (2005) los haplotipo A y L se ha encontrado en simpatria en accesiones de frijol silvestre (Figura 21). Además, encontraron que en silvestres de frijol común la distribución geografía de haplotipo de cloroplasto B, H, J, K, N, y O se limitan a Mesoamérica, en tanto que las formas C, D, E, y F se encuentran solamente en Suramérica, y otras pocas en ambas áreas como A, G, I, y L.

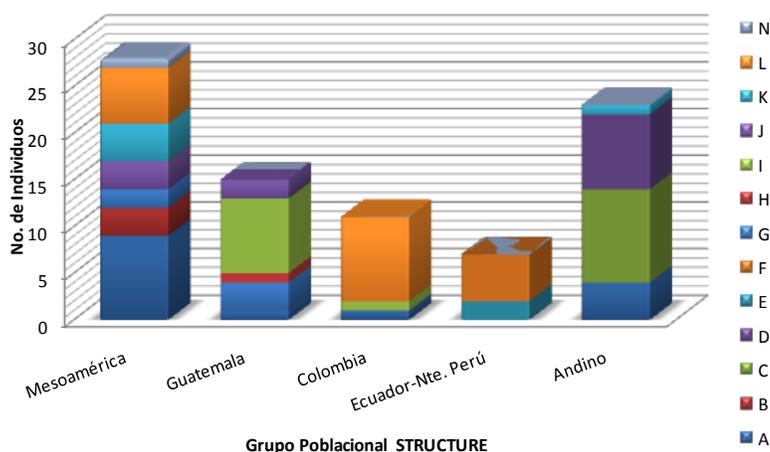


Figura 21. Distribución del haplotipo de cloroplasto dentro de cada grupo poblacional basado en STRUCTURE.

Es de informar que en silvestres de frijol no se soporta la presencia de razas, ya que Beebe et al. (2001) sugiere que estas se han diferenciado en frijoles domesticados a través de la selección y presión ejercida por el hombre. El aislamiento temprano de comunidades basadas en la agricultura y la difusión a otras regiones Andinas con diferentes condiciones ecológicas podrían haber sido promotores en la diferenciación de frijoles cultivados.

En este estudio la estructura identificada mediante análisis de similaridad y estructura, en términos generales, es consistente con otros estudios de diversidad, en donde se lograron marcadas diferencias en las características geográficas y moleculares entre acervos genéticos (Tohme et al., 1996, Blair et al., 2006). La separación entre estos dos grandes acervos genéticos ya ha sido bien estudiado en repetidas ocasiones basados en información fenotípica y molecular y sugiriendo que el *P. vulgaris* presenta una incipiente sub-especiación producto de las barreras geográficas. Lo anterior es sustentado por un parcial aislamiento reproductivo, incluyendo híbridos débiles en la F1 y generaciones tardías (Kwak y Gepts, 2009).

Las poblaciones de frijol silvestres muestran una contrastante estructura interna. Las accesiones Mesoamericanas, con excepción de las accesiones Guatemaltecas, no presentan grupos asociados con características específicas como proteína de semilla, contrastante con el acervo Andino que presenta subgrupos definidos de acuerdo a orígenes específicos y otros rasgos característicos. Las barreras geográficas de los Andes en Perú, Bolivia y Argentina han creado ambientes aislados que han conducido al aislamiento genético del frijol silvestre para estas zonas, mientras que el mismo proceso no parece haber ocurrido en la región de Mesoamérica donde no existe tales barreras.

4.6. DIVERSIDAD ALÉLICAS DE LOS GRUPOS GENERADOS

Con el fin de hacer una comparación más general de los acervos de frijol se usaron las asociaciones generadas por el programa STRUCTURE, ya que accesiones que en el análisis de similaridad se presentaban atípicas mediante este programa se agruparon a través de las poblaciones obtenidas.

La colección referencia de silvestres de frijol común reportó un índice de diversidad genética de 0.551, esto es considerado alto si se compara con resultados obtenidos en estudios anteriores en accesiones silvestres pero con marcadores como alozimas (0.132) (Koenig and Gepts, 1989), RFLP (0.38) (Becerra and Gepts, 1994) y AFLP (0.31) (Tohme et al., 1996), pero inferior al reportado con RFLP en polimorfismos de DNA de cloroplastos (0.837) (Chacon et al., 2005), y otros estudios con SSR que incluyen frijoles cultivados y silvestres (0.64) (Kwak y Gepts, 2009).

Aunque no se puede comparar el polimorfismo alélico y la diversidad genética entre los grupos, debido al desequilibrio en el tamaño de muestra que existe entre ellos, se percibe una cierta tasa de especificidad superior en las accesiones del grupo Mesoamericano.

La diversidad genética (Tabla 11) en Mesoamérica total fue más alta que la del acervo Andino total (0.563 y 0.507, respectivamente). Lo anterior es congruente si se compara con otros estudios como Becerra y Gepts (1994) donde por medio de RFLPs en 85 accesiones silvestres y cultivadas de frijol común revelaron una diversidad genética de 0.310 en mesoamericanos y 0.280 en Andinos, así como en estudios con Polimorfismos de ADN de cloroplasto revelaron una diversidad genética de 0.844 en Mesoamericanos silvestres frente a 0.830 en Andinos del mismo tipo. El estudio de Kwak y Gepts (2009) con SSRs encontraron en accesiones silvestres una diversidad genética similar de 0.570 en Mesoamericanos y 0.530 en Andinos.

Tabla 11. Diversidad genética de la colección referencia de silvestres de frijol común.

Población	N	Na	Ho	DG	%P
Mesoamérica	44	8.135	0.111	0.625	97.30%
Guatemala	16	5.162	0.089	0.594	94.59%
Colombia	13	4.622	0.087	0.602	97.30%
Ecuador-Net Perú	7	2.865	0.061	0.430	67.57%
<i>Total Mesoamérica</i>	<i>80</i>	<i>5.196</i>	<i>0.087</i>	<i>0.563</i>	<i>89,19%</i>
Andino	28	6.784	0.071	0.507	94.59%
Total Colección	108	5.514	0.084	0.551	90.27%

N: Tamaño de muestra; Na: No. de alelos; He: Heterocigosidad esperada; DG: Diversidad genética; %P: Porcentaje de Polimorfismo

En el grupo de Ecuador-Norte del Perú es donde se observa la menor diversidad genética con un índice de 0.430 y el menor porcentaje de loci polimórficos (67.57%) indicándonos que de los 36 marcadores SSRs utilizados 24 se comportaron de forma polimórfica, esto debido a que posiblemente es una población ancestral de los acervos Mesoamericano y Andino que se ha conservado a través del tiempo por su aislamiento geográfico. El grupo Andino presentó el mayor porcentaje de loci polimórficos (90.27%), es decir, que de 36 SSRs utilizados tres resultaron monomórficos.

Para cada grupo se observó predominio de algunos SSRs (Anexo E), para Mesoamérica se observaron altos índices de diversidad con los marcadores GATs91, genómico y PV-AT001, génico; en Andino con los SSRs BMd01, génico y GATs 91, genómico; en Guatemala con los SSRs BM188-B, genómico y BM01,

génico; Ecuador-Norte de Perú con el SSR BM156, genómico; y en Colombia, con el SSR BM175, genómico.

4.7. ANÁLISIS MOLECULAR DE VARIANZA

La estructura genética fue confirmada mediante la AMOVA generada por el programa Arlequín, indicando que las agrupaciones establecidas en las accesiones de la colección referencia de silvestres son significativas y que la mayoría de la variación es explicada por la interacción entre individuos dentro de cada población (68.45%). Sin embargo se pudo observar que la variación entre poblaciones con un 20.30%, fue mayor que la variación aportada por los individuos dentro de la población con un 11.25% (Tabla 12).

El grado de diferenciación genética entre poblaciones en términos de frecuencias alélicas fue de 0.203 (F_{ST}), de acuerdo a Wright (1965) este índice es relativamente grande, confirmando la consistente separación de los grupos en cuanto a su estructura genética, el cual es similar al valor reportado por Kwak y Gepts (2009) en accesiones silvestres.

Tabla 12. Resultados del análisis molecular de varianza (AMOVA), comparando los Poblaciones derivadas del análisis con el programa STRUCTURE.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Componentes Principales	Porcentaje de Variación
Entre poblaciones	4	282.972	1.52104 va	20.30
Entre individuos entre poblaciones	103	1143.139	5.12792 vb	68.45
Dentro de población	108	91.00	0.84259 vc	11.25
Total	215	1517.111	7.49156	100.00%
FST : 0.20303				

4.8. COMPARACIÓN SSRs CONTRA AFLP

En el estudio de Tohme et al. (1996) en el análisis de la colección referencia de silvestres de *Phaseolus vulgaris* mediante AFLP, obtuvieron que dos combinaciones de primer fueron suficientes para generar 203 bandas, de las cuales 183 resultaron polimórficas. En contraste, se obtuvo un total de 492 bandas por amplificación con 36 marcadores SSR en este estudio, de las cuales 491 bandas fueron polimórficas, es decir en porcentaje el polimorfismo en AFLP fue del 90% y en SSRs fue del 99, 8%., lo que indica que los SSRs poseen un alto poder de discriminación.

El mayor nivel de polimorfismo de los marcadores SSRs, ha contribuido a la menor similitud genética de estos (promedio 0.51) en comparación con los marcadores

AFLP (media 0.69). Esto está de acuerdo con otros estudios que comparaban el nivel de polimorfismo detectado con marcadores AFLP y SSR en frijol (Maras et al., 2008), maíz (García et al., 2004) y soya (Powell et al., 1996). El mayor polimorfismo en loci SSRs se espera debido al mecanismo mediante el cual se genera: la replicación por deslizamiento ocurre con más frecuencia que las mutaciones de un solo nucleótido y eventos de inserción/delección, que generan los polimorfismos detectables mediante AFLP (Powell et al., 1996).

Tabla 13. Comparación de grupos generados a partir de análisis con SSR vs. AFLP (Thome et al., 1996) en la colección con de silvestres de *Phaseolus vulgaris*.

SSR AFLP	Mesoamérica	Guatemala	Colombia	Ecu-Nte Perú	Andino	Total AFLPs
Mesoamérica	28	14	2	0	0	44
Colombia	3	2	11	4	3	23
Ecu-Nte Perú	0	0	0	3	0	3
Andino	7	0	0	0	23	30
Sin Grupo	4	0	0	0	0	4
Total SSRs	42	16	13	7	26	104

En términos generales en estudio con AFLPs y SSRs se comprobó una similar estructura genética en la colección de referencia de silvestres (Tabla 13), en donde se pudieron diferenciar los dos acervos principales Mesoamérica y Andino. Además ambos sistemas de marcadores presentan una comparable precisión en la agrupación de los genotipos de acuerdo a su origen genético. Sin embargo, con marcadores SSRs se pudo observar que las accesiones pertenecientes al Grupo Guatemala presentan baja similaridad con respecto a los acervos Mesoamérica y Andino, y un polimorfismo único en este grupo.

5. CONCLUSIONES

- El grupo de marcadores microsatélites marcados fluorescentemente utilizados en este estudio demostraron poseer un alto nivel de información y un excelente poder de discriminación, entre acervos y centros menores, por lo que en estudios de diversidad genética serían una herramienta valiosa a la hora de analizar la estructura y dinámica de poblaciones y/o colecciones.
- Entre los individuos de la colección referencia de silvestres de *Phaseolus vulgaris*, existe una amplia diversidad genética lo que los hace únicos en cuanto a sus características morfológicas, bioquímicas y moleculares, siendo de importancia estas diferencias para la eficiencia de esta colección en el banco de germoplasma.
- En este estudio se encontró las accesiones de origen Guatemalteco en un grupo bien definido presentando un cierto grado de diferenciación genética y estructural con el acervo Mesoamericano lo que podría representar un centro reciente de origen.
- En el grupo Colombia se observó en su diversidad una estrecha relación con el acervo Mesoamericano lo que hace suponer en mayor medida la influencia de genes de este acervo hacia esta zona geográfica, en comparación con los aportados por el acervo Andino.
- Entre las técnicas moleculares de AFLP y SSRs, estos últimos detectaron un más alto nivel de variación intraespecífica entre accesiones silvestres de *Phaseolus vulgaris* y además por ser codominantes valoraron la ocurrencia de la heterocigosidad en accesiones.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA-GALLEGOS, J. A., KELLY, J. D. y GEPTS, P. (2007) Prebreeding in Common Bean and Use of Genetic Diversity from Wild Germplasm. *Crop Sci*, 47, S-44-59.

AYAD, W., HODGKIN, T., JARADAT, A. y RAO, V. (1997). Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Report of an IPGRI workshop, 9-11 October 1995. Rome, Italy., International Plant Genetic Resources Institute.

BAZEL, P. y J. ANDERSON. (1994). Nutrition and health implication of dry beans: A review. *Journal of the American College of Nutrition* 13: 549-558.

BECERRA, V. y GEPTS, P. (1994). RFLP Diversity of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) in its centres of origin. *Genome* 37: 256-263.

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

BEEBE, S., TORO, O., GONZALESZ, A. V., CHACÓN, M. I. y DEBOUCK, D. (1997) Wild-weed-crop complex of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) in the Andes of Peru and Colombia, and their implications for conservation and breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44, 73-91.

BEEBE, S., RENJIFO, J., GAITAN-SOLIS, E, DUQUE, M.C. y TOHME, J. (2001). Diversity and origin of andean landraces of common bean. *Crop Sci* 41: 854-862.

BEEBE, S., SKROCH, P., TOHME, J., DUQUE, M.C., PEDRAZA, F. y NIENHUIS, J. (2000). Structure of genetic diversity among common bean landraces of middle american origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop Sci* 40: 264-273.

BENCHIMOL, L. L., CAMPOS, T. D., MORAIS CARBONELL, S. A., COLOMBO, C. A., CHIORATTO, A. F., FERNANDES FORMIGHIERI, E., LIMA GOUVEA, L. R. y PEREIRA DE SOUZA, A. (2007) Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers. *Genet resour Crop Evol*, 54, 1747-1762.

BETANCOUR R, M. J. y QUIRÓS D., J. E. (2002) El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Cultivo, Beneficio y Variedades.

BLAIR, M. W., HEDETALE, V. y MCCOUCH, S. R. (2002) Fluorescent-labeled microsatellite panels useful for detecting allelic diversity in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 105, 449-457.

BLAIR, M., PEDRAZA, F., BUENDIA, H., GAITAN, E., BEEBE, S., GEPTS, P. y TOHME, J. (2003) Development of a genome wide anchored microsatellite for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet*, 107, 1362-1374.

BLAIR, M., GIRALDO, M., BUENDIA, H., TOVAR, E., DUQUE, M. y BEEBE, S. (2006) Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet*, 113, 100-109.

BLAIR, M. W., DÍAZ, J. M., HIDALGO, R., DÍAZ, L. M. y DUQUE, M. C. (2007) Microsatellite characterization of Andean races of commonbean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 116, 29-43.

BLAIR, M. W., BUENDÍA, H. F., GIRALDO, M. C., MÉTAIS, I. y PELTIER, D. (2008) Characterization of AT-rich microsatellites in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet*, 118, 91-103.

BROUGHTON, W. J., HERNANDEZ, G., BLAIR, M., BEEBE, S., GEPTS, P. y VENDERLEYDEN, J. (2003) Bean (*Phaseolus* spp) - model food legumes. *Plant and soil*, 252, 55- 128.

BROWN, A. (1989) Core collections: a practical approach to genetic resources management. *Genome*, 31, 818-824.

BUSO, G. S. C., AMARAL, Z. P. S., BRONDANI, R. P. V. y FERREIRA, M. C. (2006) Microsatellite markers for the common bean *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Ecology Notes* (6, 252-254.

CAMPOS, T. D., BENCHIMOL, L. L., MORAES CARBONELL, S. A., CHIORATTO, A. F., FERNANDES FORMIGHIERI, E. y PEREIRA DE SOUZA, A. (2007) Microsatellites for genetic studies and breeding programs in common bean. *Pesq. agropec. bras.*, 42, 589-592.

CATTAN-TOUPANCE, I, MICHALAKIS, Y. y NEEMA, C. (1998). Genetic structure of wild bean populations in their south-Andean centre of origin. *Theor Appl Genet* 96: 844-851.

CHACON , M. I., PICKERSGILL, S. y DEBOUCK, D. (2005) Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of Mesoamerican and Andean cultivated races. *Theor Appl Genet*, 110, 432-444.

CHACÓN, M.I., PICKERSGILL, S., DEBOUCK, D. y ARIAS, S. (2008). Phylogeographic analysis of the chloroplast DNA variation in wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Americas. *Pl. Syst. Evol.*

CIAT, CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. (1993). Bean Program Annual report. Cali, Colombia.

COBURN, J. R., TEMNYKH, S. V., PAUL, E. M. y MCCOUCH, S. R. (2002) Design and Application of Microsatellite Marker Panels for Semiautomated Genotyping of Rice (*Oryza sativa* L.). *Crop Sci*, 42, 2092-2099.

COLLARD, B., JAHUFER, M., BROUWER, J. y PANG, E. (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (qtl) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*, 142, 169-196.

DE VICENTE, M. C. (2002) Molecular technique to facilitate prioritization of plant genetic resources conservation and further research. *AgBiotechNet*, 4 July, 1-5.

DE VICENTE, M. C. (2004) The Evolving Role of Genebanks in the Fast-developing Field of Molecular Genetics. *Issues in Genetic Resources* No. XI, August 2004, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

DEBOUCK, D., TORO, O., PAREDES, O., JOHNSON, W. y GEPTS, P. (1993). Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* L. (Fabacea) in northwestern south America. *Economic Botany* 47(4): 408-423.

DEBOUCK, D. y TOHME J. (1989). Implications for bean breeders of studies on the origins of common beans, *Phaseolus vulgaris* L. In: Beebe S. (ed), *Current Topic in Breeding of Common Bean*.(47): 3-42.

DEBOUCK, D. G. y HIDALGO, R. (1985) Morfología de la planta de frijol común. In: *Frijol: Investigación y Producción*. CIAT-PNUD.

DIAZ, L. M., DIAZ, J. M. y BLAIR, M. W. (2005) Diversidad genética de frijol Común (*Phaseolus vulgaris* L.) en Colombia. *Fitotecnia Colombia*, 5, 28-36.

EXCOFFIER L., LAVAL, G., y SCHNEIDER, S. (2006). Arlequin3.1: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. *Computational and Molecular Population Genetics Lab*. Institute of Zoology University of Berne. Switzerland

FALUSH, Daniel; STEPHENS, Matthew y PRITCHARD, Jonathan (2003) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics*.164:1567-1587.

FERREIRA, M. C. y GRATTAPAGLIA, D. (1998) Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético, Embrapa, Brasilia, Brasil.

FREYRE, R., SKROCH, P. W., GEFFORY, V., ADAM-BLONDON, A. F., SHIRMOHAMADALI, A., JOHNSON, W. C., LLACA, V., NODARI, R. O., PERIERA, P. A., TSAI, S. M., TOHME, J., DRON, M., NIENHUIS, J., VALLEJOS, C. E. y GEPTS, P. (1998) Towards an integrated linkage map of common bean. 4 Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. *Theor Appl Genet*, 97, 847-856.

FREYRE, R., RIOS, R., GUZMAN, L., DEBOUCK, D. and GEPTS, P. (1996) Ecogeographic distribution of *Phaseolus* spp (Fabaceae) in Bolivia. *Economic Botany* 50(2): 195-215.

FRISCH, M., M. Quint, T. Lubberstedt, A.E. Melchinger, 2004 Duplicate Marker Loci Can Result in Incorrect Locus Orders on Linkage Maps. *Theor Appl Genet* 109: 305-316.

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

GEPTS, P. y BLISS, F. (1986). Phaseolin variability among wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Colombia. *Economic Botany* 40(4): 469-478.

GEPTS, P., OSBORN, T., RASHKA, K. y BLISS, F. (1986) Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): evidence for multiple centers of domestication. *Economic Botany* 40(4): 451-468.

GEPTS, P. (1988). Phaseolin as an evolutionary marker. En: Resources of phaseolus beans. GEPTS, P. Kluwer Academic publishers. 215-241.

GEPTS, P. y DEBOUCK, D. (1991). Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). En: Common beans: Research for crop improvement. VAN SHOONHOVEN, A. and VOYSEST, O. Wallingford, Common Wealth Agricultural Bureau. 7-53.

GEPTS, P. (1993). The use of molecular and biochemical markers in crop evolution studies. En: Evolutionary Biology. HECHT, M. and AL, ET. New York, Plenum Press. 27: 51-93.

GEPTS, P. y PAPA, R. (2003). Possible effects of (trans) gene flow from crops on the genetic diversity from landraces and wild relatives. *Environ. Biosafety Res* 2: 89-103.

GONZALEZ, Laura (2008) Evaluación de la Diversidad Genética en una Colección de Germoplasma de Frijol Común (*Phaseolus vulgaris*) de Ruanda (África). Tesis, Biología. CIAT-Universidad Javeriana.

GRISI, M. C. M., BLAIR, M. W., GEPTS, P., BRONDANI, C., PERERA, P. A. A. y BRONDANI, R. P. V. (2007) Genetic mapping of a new set of microsatellite markers in a reference common bean (*Phaseolus vulgaris*) population BAT93 x JALO EEP558. *Genetics and Molecular Research*, 6, 691-706

HODGKIN, T. (1995) Some current issues in the conservation and use of plant Genetic Resources. In: *Molecular Genetic techniques for plant genetic resources*. Report of IPGRI workshop (Ed. T. H. W.G.AYAD, A. JARADAT y V.R. RAO). Roma.

IDURY, R. M. y CARDON, L. R. (1997) A Simple Method for Automated Allele Binning in Microsatellite Markers. *GENOME RESEARCH*, 7, 1104-1109.

IPGRI (2000) Core collections of plant genetic resources. IPGRI, Rome, Italy.

IPGRI y Cornell University (2003). Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje. Tecnologías basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP).

JOE, L. K., WHEATON, A. M., BAY, S. J., KROTZER, L. E., BAYBAYAN, P. A., OSTADAN, O. S., BEROSIK, S. R., YANG, T. H., PISTACCHI, S. A., FENG, S.-S. y LOU, Y. N. (2004) Improved Solutions for High Throughput Microsatellite Analysis. (Ed. A. BIOSYSTEMS). California.

KAMI, J., VELAZQUES, V., DEBOUCK, D. y GEPTS P., (1995) Identification of Presumed Ancestral DNA Sequences of Phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 62: 1101-1104.

KWAK, Myounghai y GEPTS, Paul. (2009) Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L. Fabaceae). *Theor Appl Genet*.

KHAIRALLA, M., SEARS, B. y ADAMS, M. (1992) Mitochondrial restriction fragment length polymorphisms in wild *Phaseolus vulgaris* L.: insights on the domestication of the common bean. *Theor Appl Genet*, 84, 915-922.

KOENIG, R. y GEPTS, P. (1989) Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of genetic diversity. *Theor Appl Genet*, 78, 809-817.

- LAURENTIN, Hernan (2009) Data Analysis for molecular characterization of plant genetic resources. *Genet Resour Crop Evol.*
- LI, Y.-C., KOROL, A. B., FAHIMA, T., BEILES, A. y NEVO, E. (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11, 2453-2465.
- MASI, P., SPAGNOLETTI ZEULI, P. y DONINI, P. (2003) Development and analysis of multiplex microsatellite markers sets in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Breeding*, 11, 303-313.
- MÉTAIS, I., HAMON, B., JALOUZOT, R. y PELTIER, D. (2002) Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 104, 1346 - 1352.
- MIKLAS, P. N., KELLY J.D., STEVE E.B. y MATTHEW W.B. (2005) Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding. *Euphytica*, 2005, 1-27.
- MIKLAS, P. N. y SINGH, S. P. (2007) Common Bean. In: *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants* (Ed. C. KOLE). Berlin.
- MORENO, Natalia (2007) Caracterización molecular y nutricional de 221 variedades Africanas de frijol Común (*Phaseolus vulgaris*) postuladas como parentales en un programa de mejoramiento nutricional. Tesis, Biología. CIAT-Universidad Javeriana.
- NEI, M. (1972) Genetic Distance between Populations. *American Naturalist* 106: 238-292.
- NEI, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York.
- OHTA, T. (1986) Simulating Evolution by Gene Duplication. *Genetics* 115, 207-213.
- OLIVEIRA, E. J., GOMES PÁDUA, J., ZUCCHI, M. I., VENCOVSKY, R. y CARNEIRO VIEIRA, M. L. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 294-307.
- PAPA, R., ACOSTA, J., DELGADO-SALINAS, A. y GEPTS, P. (2005) A genome-wide analysis of differentiation between wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* from Mesoamérica. *Theor Appl Genet*, 1114, 1147-1158.

- PAPA, R. y GEPTS, P. (2003) Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris*L.) from Mesoamérica. *Theor Appl Genet*, 106, 239-250.
- PAYRÓ-DE-LA-CRUZ, E., GEPTS, P., GARCIMARÍN, P. C. y VILLAREAL, D. Z. (2005) Spatial distribution of genetic diversity in wild populations of *Phaseolus vulgaris* L. from Guanajuato and Michoacán, México. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1-11.
- PEDROSA, A., VALLEJOS, C., BACHMAIR, A. y SCHWIZER, D. (2002) Integration of common bean (*Phaseolus vulgaris*) linkage and chromosomal maps. *Theor Appl Genet*.
- PICCA, A., HELGUERA, M., SALOMÓN, N. y CARRERA, A. (2004) Herramientas Básicas: Marcadores moleculares. In: *Biotecnología y mejoramiento Vegetal* (Eds. D. V. ECHENIQUE, D. C. RUBINSTEIN y I. A. L. MROGINSKI). INTA ed.
- POWELL, W., MORGANTE, M., ANDRE, C., HANAFEY, M., VOGEL, J., TINGEY, S. y RAFALSKI, A. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2, 25-238.
- RÍOS, M. J. B. y DAVILA, J. E. Q. (2002) El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Cultivo, Beneficio y Variedades.
- PRITCHARD, Jonathan, STEPHENS, Matthew y DONELLY, Peter (2000) Inference of Population Structure Usin Multilocus Genotype Data. *Genetics*. 155:945-959.
- RÍOS, M.J.B., DAVILA, J.E.Q. (2002) El Fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.): Cultivo, Beneficio y Variedades., Pp. 17-20.
- RODRIGO M., A. P. (2000) Caracterizacion morfoagronómica y bioquímica de germoplasma de judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) de España. In: *Biología*. Universidad Santiago de Compostela, Pontevedra.
- ROHLF, F. (2002) Ntsys Pc: Numerical Taxonomy System. Setauket,. Exter Publishing. Ny.
- SANTALLA, M., MENENDEZ-SEVILLANO, M., MONTEAGUDO, A. y DE RON, A. (2004) Genetic diversity of Argentinian common bean and its evolution during domestication. *Euphytica*, 135, 75-87..
- SHNCHEIDER, S. ROCSSLI, D. y EXCOFFIER. L. (2000). Arlequin: A Software for Population Genetics Data Analysis, Version 2.0. Department of Anthropology, University of Geneva Switzerland.

SINGH, S., GEPTS, P. y DEBOUCK, D. (1991) Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany*, 45, 379-396.

SINGH, S. P. (1999) Production and Utilization. In: *Common Bean Improvement in the Twenty-First Century* (Ed. S. P. SINGH). Kluwer Academic Publishers, Kimberly, U.S.A.

SINGH, S. P. (2001) Broadening the Genetic Base of Common Bean Cultivars: A Review. *Crop Sci*, 41:, 1659-1675.

TOHME, J., JONES, P., BEEBE, S. y IWANAGA, M. (1995) The combined use of agroecological and characterisation data to establish the CIAT *Phaseolus vulgaris* core collection. En: *Core collections of plant genetic resources*. HODGKIN, T., BROWN, A., VAN HINTUM, TH. and MORALES, E. Wiley - Sayce Publication.

TOHME, J., GONZALES, D., BEEBE, S. y DUQUE, M. C. (1996) AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop Sci*, 36, 1375-1384.

URG-CIAT (2009) Bases De Datos Del Frijol. Unidad De Recursos Genéticos, Palmira.

VARSHNEY, R. K., GRANER, A. y SORRELLS, M. E. (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS in Biotechnology*, 23.

VELÁSQUEZ, J. A. y GIRALDO, P. A. (2005) Posibilidades competitivas de productos prioritarios de Antioquia frente a los acuerdos de integración y nuevos acuerdos comerciales.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.

VOYSEST, O. (2000) Mejoramiento genético de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) : Legado de variedades de America Latina 1930-1999., Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.

YOU-CHUN LI, A. B. K., TZION FAHIMA, AVIGDOR BEILES, EVIATAR NEVO (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11, 2453-2465.

YU, K., PARK, S. y POYSA, V. (1999) Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). *Genome*, 42, 27-34.

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

ZHANG, Xiaoyan; BLAIR, Matthew; WANG, Shumin (2008) Genetic diversity of Chinese common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Landraces assessed with simple sequence repeat markers. Theor Appl Genet. 117:629-640.

ANEXOS

Anexo A. Protocolo de Extracción, Kit Viogene PGP1002

Consideraciones iniciales:

- Precalentar baño María a 65°C.
 - Precalentar el Tris-EDTA a 65°C
 - Tener marcados dos series de tubos de 1.5 limpios, para transferir los filtrados y almacenar ADN.
1. Macerar 20 mg de material liofilizado (tejido foliar) hasta obtener un polvo fino homogéneo, en un tubo de 2 ml.
 2. Añadir al tejido 400 ul de Buffer PX1 y 4 ul de RNAsa A, agitar en vortex vigorosamente, inmediatamente incubar la mezcla a 65 °C POR 10 minutos por 10 minutos, mezclando por inversión cada 3 minutos.
 3. Añadir 130 ul de Buffer PX2 al lisado, agitar vortex e incubar en hielo por 5 minutos.
 4. Transferir (con la ayuda de una espátula limpia) el lisado a una columna o tubo Shearing, adaptado a un tubo colector, centrifugar a 13.000 rpm por 2 minutos.
 5. Transferir el liquido filtrado en el tubo colector a un nuevo tubo de 1.5 ml, sin pipetear ningún residuo o precipitado.
 6. Adicionar 0.5 volúmenes de Buffer PX3 y 1 volumen de etanol absoluto, al lisado transferido en el paso anterior. Invertir suavemente 3-5 veces. Ejemplo: si se transfiere 400 ul del lisado, adicionar 200 ul de PX3 y 400 ul de etanol filtrado.
 7. En nuevo tubo colector, colocar una mini columna para ADN genómico (columna purificación), y adicionar 650 ul de la muestra (a la cual fue adicionado el etanol), centrifugar por 10000 rpm por 1 minuto, y descartar el filtrado.
 8. .Repetir el paso 7, para el resto de la muestra no filtrada.
 9. Lavar con 700 ul de Buffer WS, la mini columna, centrifugando a 14000 rpm de 30 a 60 segundos y descartar el filtrado.
 10. Repetir el lavado con 700 ul de Buffer WS.
 11. Centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos, para remover cualquier residuo del Buffer WS.
 12. transferir la mini columna a un tubo limpio de 1.5 ml, y adicionar 200 ul de TE precalentado a 65 °C, dejar incubar por 1-3 minutos y centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto, para eludir el ADN.
 13. Concentrar el ADN en Speedvac, modo acuoso a 30 °C, hasta obtener un volumen de 100 ul.
 14. Almacenar ADN a – 20 °C.

Anexo B. Organización en paneles de los marcadores microsatélite marcados fluorescentemente, teniendo en cuenta la secuencia, rango alélico y el motivo de cada uno.

Primer ID	Panel	FLUORE	Color	Tipo	Motivo	pb min	pb max	DIFF	Link GDYG
GATS91	5a	6-FAM	blue	GENOMICO	(GA) ₁₁	199	251	52	b02d
BMd08	5a	NED	yellow	GENICO	(CT) ₇	174	190	16	mono
BMd20	5a	VIC	green	GENICO	(TA) ₅	116	128	12	b05e
BM172	5a	PET	red	GENOMICO	(GA) ₂₃	79	123	44	b03c
BM188-A	5b	NED	yellow	GENOMICO	(CA) ₁₈ (TA) ₇	144	158	14	b09k
BM188-B	5b	NED	yellow	GENOMICO	(CA) ₁₈ (TA) ₇	160	198	38	b09k
BM175	5b	VIC	green	GENOMICO	(AT) ₅ (GA) ₁₉	149	191	42	b05e
BM200	5b	6-FAM	blue	GENOMICO	(AG) ₁₀	201	291	90	b01
BM205	5b	PET	red	GENOMICO	(GT) ₁₁	87	147	60	b07a
BM139	6a	PET	red	GENOMICO	(CT) ₂₅	82	128	46	b02d
BM156	6a	6-FAM	blue	GENOMICO	(CT) ₃₂	207	279	72	b02d
PV-CTT001	6a	VIC	green	GENICO	(CTT)	135	180	45	b03c
BM160	6a	NED	yellow	GENOMICO	(GA) ₁₅ (GAA) ₅	170	227	57	b07a
PV-AG003	6b	NED	yellow	GENICO	(AG) ₈	149	165	16	b01h
BMd01	6b	6-FAM	blue	GENICO	(AT) ₉	166	198	32	b03c
BMd02	6b	PET	red	GENICO	(CGG) ₈	98	110	12	b02d
BMd16	6b	VIC	green	GENICO	(CATG) ₄	134	158	24	b04b
BM201	7a	PET	Red	GENOMICO	(GA) ₁₅	94	146	52	b07a
AG01	7a	VIC	Green	GENOMICO	(GA) ₆ GGTA(GA)5GGGGACG(AG) ₄	102	148	46	b03c
BM140	7a	6-FAM	Blue	GENOMICO	(GA) ₃₀	156	216	60	b04b
GATS54	7a	NED	Yellow	GENOMICO	(GA) ₅ AACAGAGT(GA) ₈	101	149	48	b3
BM187	7b	VIC	Green	GENOMICO	(CT) ₁₀ T(CT) ₁₄	154	260	106	b06g
BMd17	7b	PET	Red	GENICO	(CGCCAC) ₆	92	128	36	b02d
BM183	7b	NED	Yellow	GENOMICO	(TC) ₁₄	95	169	74	b07a
PV-AT001	7b	6-FAM	Blue	GENICO	(TA) ₂₂	212	342	130	b04b
BM143	8a	PET	Red	GENOMICO	(GA) ₃₅	100	168	68	b02d
BM149	8a	6-FAM	Blue	GENOMICO	(TGC) ₆ (TAG) ₃	238	256	18	na
BM137	8a	VIC	Green	GENOMICO	(CT) ₂₃	120	248	128	b06
BMd46	8a	NED	Yellow	GENICO	(TCT) ₄	324	336	12	na
BMd47	8b	PET	Red	GENICO	(AT) ₅	143	155	12	b02d
BM141	8b	6-FAM	Blue	GENOMICO	(GA) ₂₉	170	236	66	b09k
PVCCT001	8b	VIC	Green	GENICO	(AT) ₁₂	137	153	16	mono
BMd15	8b	NED	Yellow	GENICO	(AG) ₆	149	201	52	b04b
BMd51	9a	PET	Red	GENICO	(CT) ₅	117	117	0	mono
BMd18	9a	6-FAM	Blue	GENICO	(TGAA) ₃	155	239	84	b02
PV-AT003	9a	VIC	Green	GENICO	(AT) ₄ (T) ₂	155	179	24	b04b
BMd56	9a	NED	Yellow	GENOMICO	(AT) ₅	186	192	6	b02d

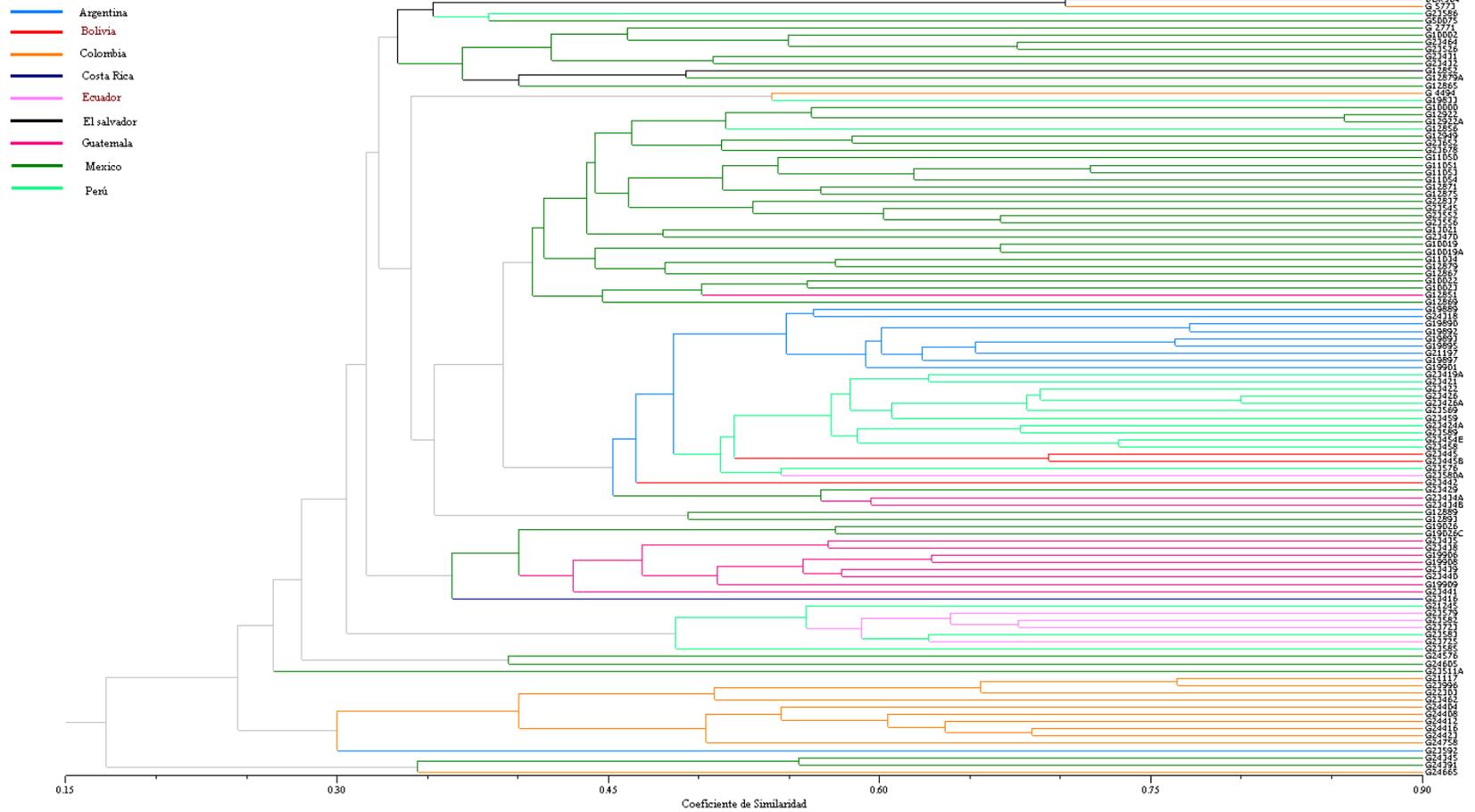
Anexo C. Datos de pasaporte de las accesiones de la Colección Núcleo de Silvestres y 4 Cultivares de *Phaseolus vulgaris*.

ID.	Número G	Acervo Genético	Grupo STRUCTURE	Habito de Crecim.	Estado Biológico	Peso (100 semillas)	Faseolina	Haplotipo de Cloropl.	Color	País	Depart.	Altitud	Latitud	Longitud
1	DOR364	M	K1	II	Cultivado	25	S	Na	Rojo	El Salvador	Na	Na	Na	Na
2	G2771	M	K1	IV	Silvestre	6,8	M20	L	Crema, Otro, Negro	México	Nayarit	1050	21,1667	-104,3667
3	G4494	A	K4	I	Cultivado	54,8	T	Na	Rojo, crema	Colombia	Na	Na	Na	Na
4	G5773	M	K1	II	Cultivado	20	B	Na	Otro	Colombia	Valle	Na	Na	Na
5	G10000	M	K1	IV	Maleza	19	S	Na	Negro	México	Guerrero	1150	18,3167	-99,8167
6	G10002	M	K1	IV	Silvestre	5	M12	Na	Otro	México	Guerrero	1380	18,4	-99,7667
7	G10019	M	K1	IV	Silvestre	9,5	M6	Na	Otro	México	Michoacán	1250	19,4667	-100,4833
8	G10019A	M	K1	IV	Silvestre	9	M1	J	Crema, Otro, Café	México	Michoacán	1250	19,4667	-100,4833
9	G10022	M	K1	IV	Silvestre	5	M10	Na	Crema, Otro, Negro	México	Durango	1829	24,1667	-104,6833
10	G10023	M	K1	IV	Silvestre	5	M20	Na	Crema, Otro, Negro	México	Durango	2027	23,7	-104,4333
11	G11034	M	K1	IV	Silvestre	4	M10	Na	Crema, Otro, Negro	México	Durango	1960	23,6167	-105,8333
12	G11050	M	K1	IV	Silvestre	8	M6	A	Café	México	Michoacán	2040	19,6833	-101,2667
13	G11051	M	K1	IV	Silvestre	5,5	M4	J	Crema, Otro, Negro	México	Jalisco	1650	20,7667	-103,4
14	G11053	M	K1	IV	Silvestre	8	M6	J	Crema, Otro, Café	México	Jalisco	1680	20,85	-103,2667
15	G11054	M	K1	IV	Maleza	19	M4	Na	Negro	México	Jalisco	1380	20,5667	-104,7667
16	G12851	M	K1	IV	Silvestre	6	M11	G	Crema, Otro, Negro	Guatemala	Santa Rosa	2000	14,2833	-90,3
17	G12852	M	K1	IV	Silvestre	5	M20	G	Crema, Otro, Negro	El Salvador	Ahuachapán	800	13,9167	-89,85
18	G12856	M	K1	IV	Silvestre	17	T	Na	Crema, Otro, Negro	Perú	Huánuco	Na	-10,3333	-76,1833
19	G12865	M	K1	IV	Silvestre	6	M3	B	Crema, Otro, Café	México	Jalisco	1219	19,3333	-103,25
20	G12867	M	K1	III	Silvestre	7	M1	Na	Crema, Otro, Café	México	Nayarit	823	21,0833	-104,5
21	G12869	M	K1	IV	Silvestre	4	M6	A	Crema, Otro, Negro	México	Michoacán	1310	19,4167	-102,5833
22	G12871	M	K1	IV	Silvestre	8	M6	Na	Crema, Otro, Negro	México	Oaxaca	1650	17,8333	-96,6333
23	G12875	M	K1	IV	Silvestre	6	M6	K	Crema, Otro, Negro	México	Oaxaca	1676	17,3167	-96,9
24	G12879	M	K1	IV	Silvestre	5	M1	A	Otro	México	Guerrero	1585	18,35	-99,9833
25	G12879A	M	K1	IV	Silvestre	4,5	M3	B	Crema, Otro, Negro	México	Guerrero	1585	18,35	-99,9833
26	G12889	M	K1	V	Silvestre	6	M12	A	Crema, Negro	México	Michoacán	1800	20,3333	-102,2167
27	G12893	M	K1	IV	Silvestre	4	M12	A	Crema, Negro	México	Guanajuato	Na	21,2167	-101,8
28	G12922	M	K1	IV	Maleza	16,5	S	L	Negro	México	Jalisco	1829	20,7	-102,35
29	G12922A	M	K1	IV	Maleza	16,2	S	L	Crema, Negro	México	Jalisco	1829	20,7	-102,35
30	G12949	M	K1	IV	Silvestre	7	M24	A	Amarillo	México	Jalisco	1829	20,6667	-102,3833
31	G13021	M	K1	IV	Silvestre	8	M6	Na	Crema, Otro, Negro	México	Oaxaca	1900	17,2167	-96,8333
32	G19026	M	K2	IV	Maleza	30	M4	I	Otro, Negro	México	Chiapas	1330	16,7333	-92,6167
33	G19026C	M	K2	IV	Maleza	11,8	M10	I	Crema, Otro, Negro	México	Chiapas	1200	16,75	-92,6333
34	G19833	A	K4	III	Cultivado	43	H	Na	Amarillo, rojo	Perú	Amazonas	1860	-6,2667	-77,75
35	G19889	A	K4	IV	Silvestre	7,4	T	D	Crema, Otro, Café	Argentina	Jujuy	1200	-24,25	-65,2833

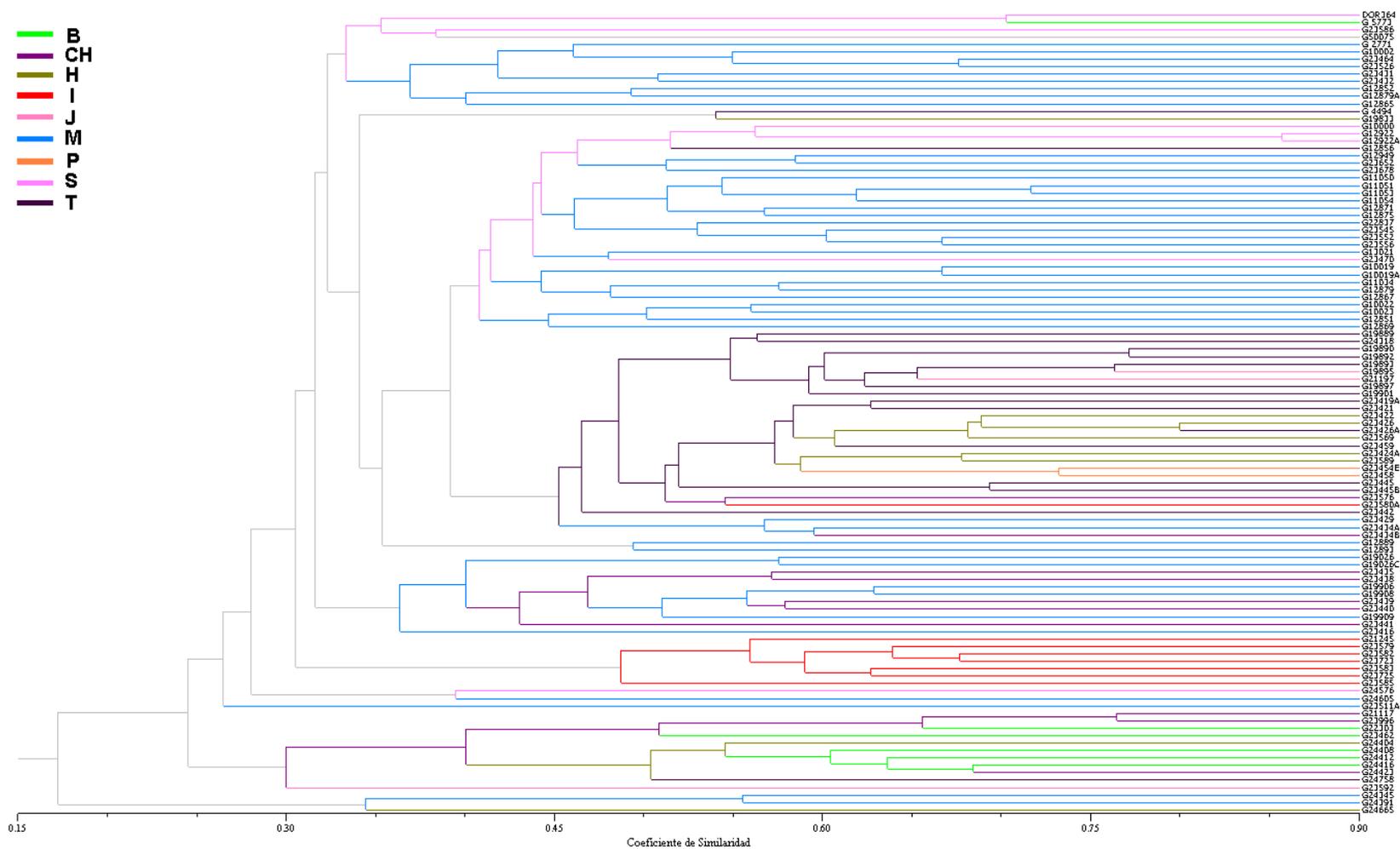
ID.	Número G	Acervo Genético	Grupo STRUCTURE	Habito de Crecim.	Estado Biológico	Peso (100 semillas)	Faseolina	Haplotipo de Cloropl.	Color	País	Depart.	Altitud	Latitud	Longitud
36	G19890	A	K4	IV	Silvestre	6,3	T	D	Crema, Otro, Café	Argentina	Salta	1380	-24,5333	-65,35
37	G19892	A	K4	IV	Silvestre	8,8	T	D	Crema, Otro, Café	Argentina	Salta	1530	-25,15	-65,65
38	G19893	A	K4	IV	Silvestre	7,6	T	D	Crema, Otro, Café	Argentina	Salta	1640	-24,6333	-65,4833
39	G19895	A	K4	IV	Silvestre	8	J1	D	Crema, Otro, Café	Argentina	Tucumán	1350	-26,4333	-65,5167
40	G19897	A	K4	IV	Silvestre	12	T	D	Crema, Otro, Café	Argentina	Tucumán	1400	-27,3167	-65,9167
41	G19901	A	K4	IV	Silvestre	9	T	D	Crema, Otro, Café	Argentina	Tucumán	1900	-26,9333	-65,7
42	G19906	M	K2	IV	Silvestre	6	M4	J	Crema, Café, Otro	Guatemala	Sacatepéquez	1550	14,45	-90,7
43	G19908	M	K2	IV	Silvestre	8,4	M10	I	Crema	Guatemala	Sacatepéquez	1550	14,5333	-90,8333
44	G19909	M	K2	IV	Silvestre	7,2	M10	Na	Crema, Otro, Negro	Guatemala	Sacatepéquez	1820	14,55	-90,8333
45	G21117	M	K3	IV	Silvestre	11,2	CH	L	Crema, Otro, Café	Colombia	Cundinamarca	1560	4,6667	-74,4
46	G21197	A	K4	IV	Silvestre	10,7	J3	C	Crema, Otro, Café	Argentina	Jujuy	1850	-24,05	-65,45
47	G21245	M	K5	IV	Silvestre	10,5	I	E, F	Crema, Otro, Café	Perú	Cajamarca	1790	-7,1167	-78,7833
48	G22303	M	K3	IV	Silvestre	7,3	B	Na	Negro	Colombia	Cundinamarca	1900	4,5333	-73,9167
49	G22837	M	K1	IV	Silvestre	11,1	M4	K	Crema, Café	México	Chihuahua	1750	26,9333	-106,4167
50	G23416	M	K2	IV	Silvestre	6	M1	H	Otro, Café, Crema	Costa Rica	San José	1750	9,8167	-84,1167
51	G23419A	A	K4	IV	Silvestre	9,2	T	C	Crema, Café, Otro	Perú	Junín	2110	-11,2333	-75,5333
52	G23421	A	K4	IV	Silvestre	13,4	T	Na	Crema, Otro, Café	Perú	Junín	2650	-12,0167	-74,8833
53	G23422	A	K4	IV	Silvestre	14	H	C	Otro, Café, Crema	Perú	Apurímac	2560	-14	-73,1667
54	G23424A	A	K4	IV	Silvestre	13	H	Na	Otro, Café, Crema	Perú	Apurímac	2340	-13,65	-72,9
55	G23426	A	K4	IV	Silvestre	9,4	H	C	Crema, Otro, Negro	Perú	Apurímac	2440	-13,6167	-73,2
56	G23426A	A	K4	IV	Maleza	24,2	T	A	Otro, Negro, Amarillo	Perú	Apurímac	2440	-13,6167	-73,2
57	G23429	A	K4	IV	Silvestre	7	M4	K	Crema, Otro, Negro	México	Puebla	1430	18,9667	-98,3833
58	G23431	M	K1	IV	Silvestre	6	M1	L	Otro, Negro, Crema	México	México	1630	19,0333	-100,05
59	G23432	M	K1	IV	Silvestre	4	M10	B	Otro, Negro, Crema	México	México	1890	18,95	-99,4333
60	G23434A	M	K2	IV	Maleza	10,7	M4	J	Negro	Guatemala	El Progreso	1250	15,0667	-89,9333
61	G23434B	M	K2	IV	Maleza	9	CH	I	Negro	Guatemala	El Progreso	1250	15,0667	-89,9333
62	G23435	M	K2	IV	Silvestre	4,8	CH	G	Crema, Otro, Negro	Guatemala	Chiquimula	1390	14,55	-89,6333
63	G23438	M	K2	IV	Silvestre	5,2	CH	I	Crema, Otro, Café	Guatemala	Jalapa	1510	14,6833	-89,8
64	G23439	M	K2	IV	Silvestre	6	CH	G	Crema, Otro, Negro	Guatemala	Santa Rosa	1430	14,4333	-90,1333
65	G23440	M	K2	IV	Silvestre	6	CH	G	Crema, Otro, Negro	Guatemala	Guatemala	1740	14,4167	-90,5833
66	G23441	M	K2	IV	Silvestre	7,2	CH	I	Crema, Otro, Negro	Guatemala	Guatemala	1740	14,4333	-90,5167
67	G23442	A	K4	IV	Silvestre	10,2	T	A	Crema, Otro, Café	Bolivia	Cochabamba	2270	-17,7833	-65,1667
68	G23445	A	K4	IV	Silvestre	10,4	T	A	Crema, Otro, Café	Bolivia	Tarija	2100	-21,5333	-64,8667
69	G23445B	A	K4	IV	Silvestre	12	Ta	A	Crema, Otro, Café	Bolivia	Tarija	2100	-21,5333	-64,8667
70	G23454E	A	K4	IV	Maleza	16	Pa	C	Café	Perú	Cuzco	2460	-13,4667	-72,4167
71	G23458	A	K4	IV	Silvestre	12,5	Pa	C	Crema, Negro, Café	Perú	Cuzco	2780	-13,8167	-71,85
72	G23459	A	K4	IV	Silvestre	12,2	T	C	Crema, Otro, Café	Perú	Cuzco	2370	-13,5	-72,65
73	G23462	M	K3	IV	Silvestre	7,9	B	Na	Crema, Otro, Café	Colombia	Cundinamarca	1900	5,0833	-73,6167
74	G23464	M	K1	IV	Silvestre	6	M12	A	Crema	México	Morelos	1250	18,9	-99,0333

ID.	Número G	Acervo Genético	Grupo STRUCTURE	Habito de Crecim.	Estado Biológico	Peso (100 semillas)	Faseolina	Haplotipo de Cloropl.	Color	País	Depart.	Altitud	Latitud	Longitud
75	G23470	M	K1	IV	Silvestre	4,1	S	L, K	Crema, Otro, Café	México	Oaxaca	950	17,3167	-96,0333
76	G23511A	M	K1	IV	Silvestre	4,3	M23	L	Café	México	Jalisco	1300	19,7167	-104,2
77	G23526	M	K1	IV	Silvestre	3,3	M18	A	Crema, Otro, Negro	México	Morelos	1950	18,9667	-99,0333
78	G23545	M	K1	IV	Silvestre	9,6	M1	N	Crema	México	Durango	1990	24,3333	-104,2833
79	G23552	M	K1	V	Silvestre	7,1	M4	K	Crema	México	Durango	1460	23,6	-104,3333
80	G23556	M	K1	V	Silvestre	8,5	M4	K	Otro	México	Durango	1860	24	-104,7333
81	G23569	A	K4	IV	Maleza	42,8	H	C	Otro	Perú	Cuzco	2940	-13,8	-71,85
82	G23576	A	K4	IV	Maleza	62,1	CH	C	Amarillo, Rojo	Perú	Cuzco	2830	-13,4667	-72,3833
83	G23579	M	K5	IV	Silvestre	11	I	F	Crema, Otro, Café	Ecuador	Azuay	1990	-3,1833	-79,1667
84	G23580A	A	K4	IV	Maleza	32,4	I	Na	Crema, Morado	Ecuador	Azuay	1930	-3,2	-79,1833
85	G23582	M	K5	IV	Silvestre	8,4	I	F	Crema, Otro, Café	Ecuador	Chimborazo	1710	-2,2667	-78,9667
86	G23583	M	K5	IV	Silvestre	7,9	I	F	Crema, Otro, Café	Perú	Piura	920	-5,4	-79,6167
87	G23585	M	K5	IV	Silvestre	8,4	I	E	Crema, Otro, Café	Perú	Cajamarca	930	-6,35	-79,4
88	G23586	M	K1	II	Escapado	20	S	Na	Otro	Perú	Cajamarca	930	-6,35	-79,4
89	G23589	A	K4	IV	Silvestre	10,5	H	C	Crema, Otro, Negro	Perú	Apurímac	2300	-13,6667	-72,8833
90	G23592	M	K1	IV	Silvestre	3,2	J2	Na	Crema, Otro, Negro	Argentina	Na	1800	Na	Na
91	G23652	M	K1	IV	Silvestre	6,2	M2	Na	Crema, Negro, Otro	México	Puebla	Na	Na	Na
92	G23678	M	K1	IV	Silvestre	4,2	M4	A	Café	México	Jalisco	2100	20,9	-102,3667
93	G23723	M	K5	IV	Silvestre	12,7	I	F	Crema, Otro, Café	Ecuador	Chimborazo	1870	-2,2667	-78,9333
94	G23725	M	K5	IV	Silvestre	9	I	F	Crema, Otro, Café	Ecuador	Loja	1390	-4,1333	-79,9167
95	G23996	M	K3	IV	Silvestre	9,2	CH	L	Crema, Otro, Café	Colombia	Cundinamarca	1500	4,6333	-74,3667
96	G24318	A	K4	IV	Silvestre	8	T	D	Crema, Otro, Café	Argentina	Salta	1800	-24,6667	-65,5667
97	G24345	M	K3	IV	Silvestre	5	M8	A	Crema, Otro, Negro	México	Nayarit	1330	21,0333	-104,4833
98	G24391	M	K3	IV	Silvestre	5,2	M10	I	Crema, Otro, Negro	México	Nayarit	1240	20,9667	-104,4833
99	G24404	M	K3	IV	Silvestre	16,4	H	L	Crema, Otro, Negro	Colombia	Cundinamarca	1800	4,55	-73,9167
100	G24408	M	K3	IV	Silvestre	10,6	B	L	Crema, Otro, Café	Colombia	Cundinamarca	1700	4,5667	-73,9167
101	G24412	M	K3	IV	Silvestre	9	B	L	Crema, Otro, Café	Colombia	Cundinamarca	1970	4,6	-73,9
102	G24416	M	K3	IV	Silvestre	9,1	B	L	Negro	Colombia	Cundinamarca	1790	4,5	-73,9167
103	G24423	M	K3	IV	Silvestre	9,2	CH	L	Crema, Otro, Café	Colombia	Cundinamarca	1860	5,0167	-73,55
104	G24576	M	K2	IV	Silvestre	5,4	S	I	Crema, Café, Otro	México	Oaxaca	1800	16,8	-96,5167
105	G24605	M	K2	V	Silvestre	6	M24	A	Crema, Café, Negro	México	Jalisco	1960	20,7	-102,4167
106	G24665	M	K3	IV	Maleza	16	H	L	Crema, Otro, Café	Colombia	Cundinamarca	1820	4,5833	-73,9167
107	G24758	M	K3	IV	Silvestre	6,4	T	L	Crema, Otro, Café	Colombia	Boyacá	1490	5,0833	-73,3833
108	G50075	M	K2	IV	Maleza	14,8	Na	I	Crema, Otro, Negro	México	Chiapas	1030	16,5	-92,5833

Anexo D. Dendrogramas de agrupamiento por características de País de Origen, Haplotipo de Cloroplasto y Faseolina.



Dendrograma de agrupamiento usando el método UPGMA mediante el estimado de Nei -Li (DICE) basados en marcadores microsatélites con colores indicando país de origen.



Dendrograma de agrupamiento usando el método UPGMA mediante el estimado de Nei –Li (DICE) basados en marcadores microsatélites con colores indicando tipo de faseolina según Tohme et al. (1996)

Anexo E. Análisis de diversidad genética por marcador microsatélite genómico y génico.

Análisis de parámetros de diversidad (Números de alelos, Alelos efectivos, heterocigosidad observada y diversidad genética) para 5 grupos formados por el programa STRUCTURE, analizados mediante marcadores microsatélite genómicos.

Genómicos	Mesoamérica				Guatemala				Colombia				Ecuador-Norte Perú				Andino			
	Na	Ne	Ho	Ne	Ho	DG	DG	Na	Ne	Ho	DG	Na	Ne	Ho	DG	Na	Ne	Ho	DG	Na
AG01	4	2.234	0.023	1.324	0.000	0.264	0.559	4	3.436	0.063	0.732	4	2.315	0.000	0.591	5	2.706	0.000	0.643	2
BM137	5	1.207	0.045	1.000	0.000	0.000	0.173	2	1.280	0.000	0.226	5	4.122	0.000	0.788	4	1.248	0.000	0.203	1
BM139	4	2.075	0.000	3.600	0.000	0.788	0.524	3	2.315	0.000	0.591	3	2.323	0.000	0.594	11	6.400	0.000	0.862	4
BM140	7	1.759	0.081	1.000	0.000	0.000	0.437	8	3.892	0.167	0.775	5	2.991	0.077	0.692	12	8.963	0.091	0.909	1
BM141	7	3.663	0.136	4.455	0.000	0.835	0.735	5	3.220	0.188	0.712	4	1.967	0.091	0.515	16	12.062	0.143	0.934	5
BM143	16	9.537	0.114	2.882	0.000	0.703	0.905	9	5.294	0.067	0.839	7	4.566	0.091	0.818	13	9.011	0.179	0.905	3
BM149	5	1.806	0.136	1.000	0.000	0.000	0.451	2	1.064	0.063	0.063	4	1.788	0.077	0.458	2	1.508	0.071	0.343	1
BM156	12	5.708	0.317	5.556	0.200	0.911	0.835	7	4.278	0.154	0.797	6	4.122	0.000	0.788	11	6.579	0.000	0.865	6
BM160	8	3.780	0.053	1.324	0.000	0.264	0.745	4	2.169	0.000	0.556	2	1.742	0.000	0.443	12	8.672	0.000	0.904	2
BM172	4	2.299	0.000	3.769	0.000	0.791	0.572	4	2.370	0.000	0.597	5	3.470	0.083	0.743	13	6.533	0.107	0.862	4
BM175	16	8.585	0.114	3.920	0.143	0.802	0.894	8	5.626	0.188	0.849	8	6.145	0.154	0.871	11	7.259	0.071	0.878	5
BM183	14	7.130	0.243	1.849	0.571	0.495	0.872	8	5.069	0.063	0.829	3	1.476	0.077	0.335	7	5.161	0.087	0.824	4
BM187	13	7.902	0.139	1.556	0.143	0.385	0.886	6	2.332	0.067	0.591	7	5.053	0.167	0.837	13	9.484	0.238	0.916	3
BM188-A	6	2.036	0.068	3.571	0.000	0.800	0.515	4	2.510	0.125	0.621	4	3.558	0.385	0.748	2	1.237	0.000	0.195	4
BM188-B	15	7.093	0.000	3.571	0.000	0.800	0.871	9	7.111	0.000	0.887	7	3.903	0.000	0.779	11	9.000	0.000	0.906	4
BM200	18	11.322	0.091	1.000	0.000	0.000	0.922	7	4.163	0.125	0.784	6	3.756	0.154	0.763	7	6.297	0.179	0.856	1
BM201	1	2.439	0.300	4.083	0.571	0.813	0.597	7	2.795	0.333	0.664	8	3.798	0.615	0.766	5	2.237	0.391	0.565	7
BM205	1	5.461	0.136	1.000	0.000	0.000	0.826	5	2.286	0.000	0.581	7	2.364	0.538	0.600	4	2.190	0.000	0.553	1
GATs54	7	3.282	0.048	3.379	0.143	0.758	0.704	6	2.761	0.067	0.660	3	1.610	0.000	0.394	6	1.467	0.036	0.324	4
GATs91	19	14.061	0.186	2.333	0.000	0.615	0.940	10	7.111	0.188	0.887	8	5.729	0.077	0.858	14	9.924	0.179	0.916	3
PROMEDIO	200	5.169	0.112	2.609	0.089	0.501	0.698	118	3.554	0.093	0.662	106	3.340	0.129	0.669	179	5.897	0.089	0.718	65

Análisis de parámetros de diversidad (Números de alelos, Alelos efectivos, heterocigosidad observada y diversidad genética) para 5 grupos formados por el programa STRUCTURE, analizados mediante marcadores microsatélite génicos.

Génicos	Mesoamérica			Guatemala				Colombia				Ecuador-Nte Perú				Andino				
	Na	Ne	Ho	Na	Ne	Ho	DG	DG	Na	Ne	Ho	DG	Na	Ne	Ho	DG	Na	Ne	Ho	DG
BMd01	16	10.438	0.381	5	2.649	1.253	0.670	0.915	10	7.024	0.500	0.895	5	3.314	0.000	0.726	15	11.455	0.286	0.935
BMd02	5	2.564	0.150	3	2.579	1.004	0.659	0.618	3	2.074	0.067	0.536	2	1.180	0.000	0.159	2	1.039	0.038	0.038
BMd08	5	2.415	0.091	1	1.000	0.000	0.000	0.593	4	3.180	0.063	0.708	5	4.829	0.000	0.825	2	1.036	0.036	0.036
BMd15	6	1.798	0.295	1	1.000	0.000	0.000	0.449	4	1.476	0.188	0.333	6	3.556	0.083	0.750	2	1.074	0.000	0.070
BMd16	2	1.406	0.000	1	1.000	0.000	0.000	0.292	2	1.882	0.000	0.484	4	1.943	0.000	0.505	2	1.036	0.036	0.036
BMd17	4	2.236	0.000	2	1.324	0.410	0.264	0.559	1	1.000	0.000	0.000	3	1.698	0.077	0.428	1	1.000	0.000	0.000
BMd18	7	4.564	0.119	4	3.333	1.280	0.778	0.790	5	3.879	0.000	0.766	2	1.899	0.000	0.492	5	3.040	0.125	0.685
BMd20	5	2.713	0.070	1	1.000	0.000	0.000	0.639	4	2.246	0.125	0.573	5	2.864	0.000	0.677	2	1.077	0.000	0.073
BMd46	3	1.953	0.068	3	2.000	0.868	0.545	0.493	4	1.388	0.063	0.288	3	1.986	0.083	0.518	2	1.324	0.000	0.249
BMd47	3	2.082	0.000	2	1.690	0.598	0.440	0.526	2	1.600	0.000	0.387	4	1.770	0.077	0.452	3	1.503	0.036	0.341
BMd51	1	1.000	0.000	1	1.000	0.000	0.000	0.000	1	1.000	0.000	0.000	1	1.000	0.000	0.000	1	1.000	0.000	0.000
BMd56	2	1.252	0.000	1	1.000	0.000	0.000	0.204	2	1.438	0.125	0.315	2	1.385	0.000	0.290	2	1.153	0.000	0.135
PV-AG003	3	1.806	0.000	2	1.690	0.598	0.440	0.452	4	2.647	0.000	0.644	3	2.074	0.077	0.538	2	1.074	0.000	0.070
PV-AT001	22	14.414	0.150	6	5.444	1.748	0.879	0.942	10	7.759	0.000	0.901	9	6.898	0.077	0.889	20	10.414	0.074	0.921
PV-AT003	5	2.347	0.214	3	2.273	0.950	0.622	0.581	6	2.783	0.000	0.661	3	2.086	0.000	0.542	3	1.176	0.080	0.153
PV-CCT001	3	1.469	0.159	1	1.000	0.000	0.000	0.323	3	1.759	0.063	0.446	3	1.374	0.154	0.283	3	1.198	0.036	0.168
PV-CTT001	9	4.466	0.182	4	2.178	1.029	0.582	0.785	8	4.697	0.250	0.813	5	4.568	0.000	0.812	5	1.849	0.107	0.468
PROMEDIO	101	3.467	0.111	41	1.892	0.573	0.346	0.539	73	2.813	0.085	0.515	65	2.613	0.037	0.523	72	2.438	0.0501	0.258