



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE MARCADORES MOLECULARES DE
INTROGRESIÓN EN VARIEDADES DE ORIGEN ANDINO Y
MESOAMERICAS DE FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris*)

Autora

Paola Denisse López Córdova

Año
2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE MARCADORES MOLECULARES DE
INTROGRESIÓN EN VARIEDADES DE ORIGEN ANDINO Y
MESOAMERICAS DE FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris*)

“Trabajo De Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología”

Profesor guía

Dr. Luis Eduardo Morillo Velastegui

Autora

Paola Denisse López Córdova

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo, Análisis de secuencias de marcadores moleculares de introgresión en variedades de origen andino y mesoamericanas de fréjol (*Phaseolus vulgaris*), a través de reuniones periódicas con el estudiante Paola Denisse López Córdova, en el semestre 201910, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Luis Eduardo Morillo Velastegui
Doctor en Recursos Fitogenéticos e Interacciones Biológicas
C.I.1708207632

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Análisis de secuencias de marcadores moleculares de introgresión en variedades de origen andino y mesoamericanas de fréjol (*Phaseolus vulgaris*), del estudiante, Paola Denisse López Córdova en el semestre 201910, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Fernando Xavier Rivas Romero
Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas
C.I. 1718092701

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Paola Denisse López Córdova
C.I. 1803818887

AGRADECIMIENTOS

Mi trabajo de titulación le dedico principalmente a Dios por darme la sabiduría, fortaleza y paciencia para salir adelante.

A mis padres Vladimir López y Lourdes Córdova quienes con su amor incondicional supieron darme todas las herramientas para luchar en la vida y alcanzar mis sueños con superación, constancia y fortaleza.

A mi hermana María Fernanda López quien siempre ha sido mi amiga, mi compañera ha estado siempre en cada parte de mi vida. A mi abuelita Juana Vayas que ha sido como mi segunda madre, me cuida con su amor y ternura, desde el cielo me sigue cuidando.

RESUMEN

El fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) o también conocido como: poroto, judía y habichuela, es considerado una de las leguminosas de mayor importancia para el consumo humano. El fréjol es una fuente rica en proteína, hidratos de carbono, vitaminas y minerales; además, puede producirse en diversos sistemas de cultivos, y ambientes, lo que facilita que sea una especie cosmopolita. En el Ecuador la producción de fréjol alcanza un porcentaje del 0.2% de la producción mundial, lo que corresponde aproximadamente 5.127 ha del área cultivada. El origen del fréjol no se ha podido aclarar aún. En Mesoamérica y la región Andina se han cuestionado el origen y edad del fréjol. Estudios previamente realizados en el Ecuador reportaron la presencia de alelos mesoamericanos en variedades tradicionales andinas; sin embargo, estos resultados no son concluyentes debido a las técnicas utilizadas como: la electroforesis para el genotipaje de marcadores microsatélites y el tamaño de los fragmentos que dificultan la cantidad de polimorfismo.

Este estudio tiene como objetivo analizar la variación genética de los marcadores candidatos de introgresión en variedades de fréjol de origen andino y mesoamericano, para lo cual se establecieron las condiciones óptimas de PCR para amplificar la gama alélica por marcador y definir alelos introgresados de interés. Se secuenciaron los alelos microsatélites (SSR) de secuencia extendida. Cuando los alelos fueron homocigotos se secuenciaron directamente, y cuando fueron heterocigotos, se clonaron. Con estos datos se realizó un análisis filogenético para los tres loci en estudio BM156, BM160, BM183, donde se mostró que el marcador BM 160 es el que mayor nivel de polimorfismo en secuencia colindante presentó y el apropiado para probar la hipótesis de introgresión. Este marcador diferenció claramente entre alelos mesoamericanos y andinos con un nivel de robustez estadístico superior al 75-80%

Palabras clave: Fréjol (*Phaseolus vulgaris*), Origen y Domesticación del fréjol, Introgresión, Marcadores microsatélites y Secuenciación

ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) or also known as bean, bean and snap bean, is considered one of the most important legumes for human consumption. Beans are some source rich in proteins, carbohydrates, vitamins and minerals. In addition, it can be produced in diverse systems of crops and environments, which facilitates it's being a cosmopolitan specie. In Ecuador, bean production reaches a percentage of 0.2% of world production, which corresponds to approximately 5.127 ha of cultivated area. The origin of beans has not been clarified yet. In Mesoamerica and the Andean region, the origin and age of beans have been questioned. Previously conducted studies in Ecuador reported the presence of Mesoamerican alleles in traditional Andean varieties. However, these results are not conclusive due to the techniques used, such as: electrophoresis for the genotyping of micro satellite markers and the size of fragments that hinder the amount of polymorphism.

The objective of this study was to analyze the genetic variation of the candidate markers of introgression in varieties of beans of Andean and Mesoamerican origin, for which optimal PCR conditions were established to amplify the allelic range by marker and to define introgressed alleles of interest. The extended sequence microsatellite alleles (SSR) were sequenced. When the alleles were homozygous, they were directly sequenced, and when they were heterozygous, they were cloned. With these data, a phylogenetic analysis was performed for three loci in study: BM 156, BM 160, BM 183, where it was shown that marker BM 160 is the one with the highest polymorphism level in adjoining sequence and the more appropriate to test the hypothesis of introgression This marker clearly differentiated between Mesoamerican and Andean alleles with a statistical robustness level greater than 75-80%.

Key words: Bean (*Phaseolus vulgaris*), Bean Origin and Domestication, Introgression, microsatellite markers and sequencing

ÍNDICE

1. CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del Problema.....	3
1.3. Objetivo General.....	3
1.4. Objetivos Específicos	3
1.5. Justificación del Problema.....	4
2. CAPITULO II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Características Generales del Fréjol.....	4
2.2. Origen y Domesticación del Fréjol.....	6
2.3. Introgresión genética entre poblaciones (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	7
2.4. Marcadores Microsatélites.....	8
2.4.1. Características Generales de marcadores SSR.....	8
2.5. Secuenciación	9
2.5.1. Características Generales de la Secuenciación.....	9
3. CAPITULO III. PROCEDIMIENTOS	10
3.1. Obtención del Material Vegetal	10
3.2. Recepción y Germinación de las Muestras.....	10
3.3. Aislamiento de Ácido nucleicos de ADN	11
3.3.1. Preparación de Soluciones de Extracción.....	11
3.3.2. Protocolo de Extracción de ADN.....	11
3.4. Cuantificación y Dilución de ADN	12
3.5. Validación de ADN	12
3.6. Validación de los oligos extendidos	13
3.7. Secuenciación de alelos SSR	14
3.8. Clonación.....	14

3.9. Cladogramas de la Gama Alélica por marcador	17
3.10. Secuenciación.....	17
3.11. Análisis Filogenético de las secuencias flanqueantes de los microsatélites	17
4. CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1. Estudio Molecular	18
4.1.1. Extracción de ADN.....	18
4.1.2. Validación del ADN extraído	19
4.1.3. Validación de los marcadores de introgresión por PCR.....	20
4.1.4. Validación de las muestras con los marcadores de introgresión por PCR	21
4.2. Clonación de alelos heterocigotas.....	25
4.3. Cladogramas de los marcadores de introgresión	26
4.4. Secuenciación y Filogenia.....	30
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	38
5.1. Conclusiones	38
5.2. Recomendaciones.....	39
REFERENCIAS	40
ANEXOS	47

1. CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia a nivel mundial. Su relevancia radica en el papel que juega en la economía campesina y como fuente vital de proteínas para varias secciones de la población (Fericely, 2014).

Desde la antigüedad, en diferentes partes del mundo se han domesticado diversas especies, entre ellas el fréjol común. Es por ello que su origen y domesticación son temas de interés científico, con implicaciones prácticas para la identificación de genes útiles y el mejoramiento genético del cultivo. (Muñoz, 2011). Según (Fitotec, 2013), el conjunto de conocimientos recabados hasta hoy establecen que el fréjol común se habría originado en Mesoamérica y posteriormente se habría domesticado entre los 5000 y 2000 años a.C en Mesoamérica (México y Centroamérica) y los Andes (Sudamérica).

Tras la domesticación, el fréjol se convirtió en una de las leguminosas más cultivadas a nivel mundial (Garver et al., 2008, pp.7-18). En nuestro país se produce el 0.2% de la producción mundial. Hoy en día se cosechan 89.789 toneladas de las 5.127 ha sembradas de fréjol (SICA, 2002), por su gran aporte en proteínas, carbohidratos y minerales (Paredes-López et al., 2006, pp.15-20), por consiguiente, la importancia económica, social y ambiental que este cultivo representa es bastante notoria, convirtiéndose en un destacado ingreso para la agricultura ecuatoriana.

Actualmente, se han realizado estudios para caracterizar la diversidad de fréjol en el Ecuador, donde se estudió la variabilidad genética en dos agroecosistemas de agricultura tradicional (Cotacachi y Saraguro), en el que se concluyó que en Cotacachi, un grupo de semillas corresponde presumiblemente al acervo andino a diferencia de Saraguro, en donde se

encontraron dos grupos de accesiones que pertenecen presumiblemente a los acervos Mesoamericanos, ya que presentaron características morfológicas típicas de semillas (Datos no publicados).

En otro estudio se realizó una comparación de la variabilidad genética de genotipos componentes de variedades de mezcla de fréjol de Cotacachi y Saraguro en los ciclos de cultivo 2009 y 2015, y Fque, además, se caracterizó el polimorfismo de nueve marcadores microsatélites en fenotipos obtenidos a partir de mixturas de fréjol encontrados en las comunidades mencionadas anteriormente, incluyendo además un grupo de materiales referenciales mesoamericanos. En este estudio se encontró que al analizar el total de la población de origen Andino y las accesiones de origen mesoamericano, se formaban dos grupos bien definidos que diferencian dos orígenes, identificándose además la presencia de alelos mesoamericanos en los materiales tradicionales de Cotacachi y Saraguro. De los nueve marcadores microsatélites estudiados se observó que en los marcadores BM139, BM164 y BM211 pueden distinguirse los dos acervos genéticos (mesoamericano y andino) en la población por su alto nivel discriminativo e informativo y los dos marcadores más informativos para las accesiones de Cotacachi y Saraguro en los dos ciclos de cultivo fueron BM160 y BM156 (Datos no publicados).

Este estudio es la continuación de las dos investigaciones anteriores en donde se analizó las secuencias de los marcadores moleculares candidatos de introgresión en variedades de fréjol de origen andino y mesoamericano (*Phaseolus vulgaris*L). En este estudio se encontró que, al analizar las poblaciones de origen andino, mesoamericano y el material vegetal con características intermedias formaban grupos bien definidos en donde se reporta la presencia de alelos mesoamericanos en materiales tradicionales de Cotacachi y Saraguro. De los tres marcadores moleculares en estudio, el marcador BM160 es el que mayor nivel de polimorfismo en secuencia colindante presentó y por lo tanto el más informativo entre los marcadores analizados

1.2. Planteamiento del Problema

A través de los estudios previamente realizados, se reportó la presencia de alelos mesoamericanos en variedades tradicionales andinas. Sin embargo, este resultado no es concluyente debido a la tecnología hasta ahora utilizada (electroforesis para el genotipaje de marcadores micro satélites); que no permite reconocer si dos o más alelos comigrantes (del mismo peso molecular) comparten la misma secuencia de ADN, y por lo tanto presentan identidad o comparten un mismo origen filogenético. Otro problema para probar la hipótesis de introgresión es el tamaño de los fragmentos obtenidos en el genotipado de ADN; estos son fragmentos cortos y en general se trata de secuencias altamente conservadas. En esta circunstancia, no es posible obtener una gran cantidad de polimorfismos, por lo que se requerirá analizar secuencias más extensas para incrementar el nivel de información para el análisis.

1.3. Objetivo General

Analizar secuencias de marcadores moleculares candidatos de introgresión mesoamericanos en variedades de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) de origen andino.

1.4. Objetivos Específicos

- Establecer condiciones óptimas de PCR para nuevas combinaciones de cebadores que permitan la amplificación de una mayor región colindante de marcadores SSRs candidatos de introgresión en fréjol andino.
- Secuenciar alelos microsatélites (SSR) de secuencia extendida mediante el método de Sanger para obtener información de polimorfismos de secuencias colindantes.
- Analizar filogenéticamente las variaciones o polimorfismos obtenidos en al menos tres loci SSRs.

1.5. Justificación del Problema

En esta investigación, las secuencias colindantes para cada alelo secuenciado de cada uno de los marcadores se compararon con la secuencia de referencia obtenida del GenBank. Este trabajo permitió determinar alelos candidatos de introgresión de origen mesoamericano presentes en variedades tradicionales andinas por medio del uso de marcadores microsatélites SSR que permitieron observar la variabilidad genética de las especies debido a las altas tasas de mutaciones que existen en los loci SSR (Blair, 2006). Una de las características más importantes de microsatélites es que tienen la capacidad para detectar polimorfismos de diversos germoplasmas, además, el polimorfismo varía dependiendo de la longitud de la secuencia y del motivo que detectan (BMC Plant Biology, 2002). Para este estudio se utilizó la técnica de clonación que permite conocer si dos o más alelos comigrantes comparten la misma secuencia de ADN y por lo tanto presentan identidad o comparten un mismo origen filogenético. Por otro lado, gracias a que el genoma del fréjol ha sido secuenciado (Nature Genetics, 2014) se han podido diseñar nuevos cebadores de manera que se extienda la zona de amplificación, con el propósito de obtener mayor información de los loci. Es por eso, que se realizó la secuenciación del ADN que es una técnica que permite proveer información para determinar el origen filogenético de los marcadores en estudio BM156, BM160, BM183.

2. CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Características Generales del Fréjol

El fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.), dentro de las leguminosas es considerado como el grano alimenticio más importante para el consumo humano, por su alto contenido nutricional. En la actualidad se produce en todo el mundo, especialmente en América Latina que es la zona de mayor producción y consumo, por lo que se estima que el 45% de la producción mundial proviene de esta zona (Voysesst Voysesst, 2000).

Phaseolus vulgaris, comúnmente conocido como fréjol común, está formado por la radícula del embrión que se convertirá en la raíz principal y tiene una longitud de 10-15 cm (Duke, 1981), tallos formados por una sucesión de nudos y entrenudos que puede ser identificado como el eje central de la planta, el tallo es herbáceo, cilíndrico o angular y puede tomar diferentes hábitos de crecimiento, las hojas pueden ser simples o compuestas (trifoliadas) que están insertadas en los nudos del tallo y las ramas, la flor es una típica flor papilionácea tiene simetría bilateral; el cáliz es gamosépalo, corola es pentámera y papilionácea, el fruto es una vaina con dos valvas que presenta diversos colores dependiendo de la variedad, y la semilla es ex albuminosa, se origina de un ovulo campilótropo y puede tener forma cilíndrica, de riñón o esférica. (Debouck e Hidalgo, 1984,).

Esta especie por sus características hacen ventajoso su consumo debido a que presenta un menor índice glucémico a diferencia de otros alimentos, ya que evita la resistencia a la insulina y el aumento de la saciedad, además, es bajo en grasas, pero rico en proteínas, hidratos de carbono, vitaminas y minerales. Es un alimento que tiene una buena fuente de fibra dietética lo que limita la velocidad de digestión debido a que la liberación de glucosa en la sangre es menor que en otros alimentos ya que se asocia a la reducción de peso y disminuye el riesgo a la obesidad (Figuerola & Avedaño, 2008). Por su alto contenido en proteínas, carbohidratos, variabilidad genética, amplia adaptación para su cultivo y habilidad para fijar el nitrógeno atmosférico hacen que el fréjol se convierta en un alimento saludable (Singh, 1999).

En Ecuador, el fréjol es una de las principales fuentes de proteínas tanto para la población rural como urbana, generalmente, considerando su hábito de crecimiento se cultivan dos tipos de fréjol común conocidos como: arbustivo y voluble; los arbustivos son cultivados en la región Sierra y en los valles mesotérmicos, a diferencia de los volubles, que son cultivados en la región sierra en la franja maicera; los dos tipos de fréjol son muy importantes en la seguridad y soberanía alimenticia de miles familias ecuatorianas (Peralta, 2005). En el

país, el fréjol común ocupa el primer lugar en producción de las leguminosas de grano comestible, este cultivo se encuentra entre los 20 a 2800 m.s.n.m., sin embargo, este cultivo puede verse afectado por problemas de tipo biótico (enfermedades por hongos y bacterias) y abiótica (falta de agua o sequía) (Murillo, 1998)

2.2. Origen y Domesticación del Fréjol

Desde el siglo XIX, científicos han considerado el origen americano para el fréjol común, debido a ciertas observaciones realizadas en restos arqueológicos desde Perú hasta el suroeste de Estados Unidos, en donde se concluyó que esta especie era originaria de las Américas (Gepts & Debouck, 1991,). Sin embargo, también se ha descubierto restos arqueológicos no solo en los Andes sino también en América Central y América del Norte como: semillas, restos de vaina o incluso plantas enteras (Kaplan & Lynch, 1973).

Actualmente, varios de los hallazgos arqueológicos son fenotípicamente similares a los cultivos actuales en la misma área, no obstante, según Kaplan, (1956), indicó que la prevalencia de los cultivares pueden haber cambiado durante varios milenios; es por eso que estos hallazgos arqueológicos comparten características en común en donde los cultivares de fréjol crecen en zonas secas haciendo que conserven su material genético. Es posible que los genotipos encontrados estaban domesticados y fueron ya introducidos por los primeros agricultores debido a su tamaño de semilla, se encuentra dentro del rango observado en los cultivares contemporáneos y los colores son similares ya sea en las mismas áreas o áreas adyacentes (Kaplan, 1956).

Hace 30 o 40 años atrás (Burkart, 1941, p. 52), describió por primera vez la población de fréjol común en estado silvestre y las poblaciones en regiones andinas, en comparación con sus contrapartes del sur de los Andes, el fréjol común silvestre de México se diferencia porque tiene racimos más cortos, brácteas de flores más grandes semillas más pequeñas a diferencia de los

Andes del sur. Estudios realizados afirman que se puede observar flujo de genes entre formas silvestres y cultivadas; en consecuencia, la domesticación ocasiono diferencias de tamaño de semilla y cantidad de faseolina; por lo que se cree que su centro de domesticación se propagó a América Central (Koenig & Gepts, 1990).

El fréjol común se domesticó en las regiones altas de América Latina hace más de 7000 años, sin embargo, se han identificado dos centros de origen para esta especie, además, se ha documentado su separación a través de patrones arqueológicos, agronómicos, proteínas y semillas como se menciona anteriormente (Kaplan, 1965).

Según investigaciones, se ha determinado que la división entre estos dos centros de origen proviene de la hibridación entre representantes de cada grupo (Singh & Gutiérrez, 1984). Estudios detallan la forma del fréjol silvestre encontradas en las regiones montañosas de México y Sudamérica, por lo que se cree que ocurrieron múltiples eventos de domesticación en cada región, originando cambios en el tamaño de la semilla entre los cultivares mesoamericanos proponiendo que fue introducida a través de la introgresión de *Phaseolus coccineus* (Miranda, 1967). Por lo tanto, la dispersión desde los centros de origen andino y mesoamericano parece haber seguido diferentes rutas o es probable que exista una intensa introgresión de germoplasma (Paredes & Gepts 1995).

2.3. Introgresión genética entre poblaciones (*Phaseolus vulgaris*)

Las poblaciones silvestres del fréjol común se distribuyen desde el norte de México hasta el noroeste de Argentina, en la cual sus recursos genéticos constituyen acervos genéticos con introgresión entre tipos silvestres y domesticados (Crop Cience, 2001). Existen evidencias de un proceso de introgresión, a pesar que son especies de autopolinización. Se han observado hibridaciones entre especies silvestres y cultivadas, así como a la vez especies

del mismo género *Phaseolus*. Esto explica la gran diversidad genética y el flujo de genes que existe en el fréjol (Theoretical and Applied Genetic, 2003), por lo tanto, el flujo de genes puede producir combinaciones interesantes con una mayor adaptabilidad al estrés ambiental o insectos (Theoretical and Applied Genetic, 2004). Estudios previos indican que los cultivos de fréjol en nuestro país evidencian introgresión entre los grupos genéticos y que la mayoría de los genotipos tienden a ser del acervo genético andino, sin embargo, también presentan del acervo mesoamericano (Theoretical and Applied Genetics, 2010).

2.4. Marcadores Microsatélites

2.4.1. Características Generales de marcadores SSR

Los microsatélites o también conocidos como repeticiones de secuencia simple SSR, son repeticiones en tándem, de motivos específicos de uno a seis nucleótidos (Morgante & Olivieri, 1993; Trends in Plant Science, 1996). Estos marcadores presentan altas tasas de mutación y variabilidad en los loci SSR, permitiendo que sean ideales para el mapeo genético y la caracterización de la diversidad genética de las especies (Matus & Hayes, 2002). Los marcadores microsatélites son muy informativos y tienen la capacidad de detectar polimorfismos en paneles de diversos germoplasmas, dependiendo de la longitud y el motivo de repetición en la secuencia (Theoretical and Applied Genetics, 2002; Plos one., 2019).

Con el paso del tiempo, ha existido una mezcla de variedades y cruces naturales entre plantas individuales, lo que da como resultado una hibridación entre las especies (Crop Science, 2006).

Actualmente, se han desarrollado marcadores microsatélites para el fréjol común (Yu & Gepts, 2000; Gaitán-Solís & Tohme, 2002), por su alto nivel de polimorfismo y la facilidad para interpretar los resultados basados en PCR

(Blair, 2006). El estudio del fréjol con marcadores microsatélites es un recurso adecuado para determinar las fuentes de variación y la adaptación que adquieren frente a las diversas condiciones climáticas (Current Science., 2017). Otra de las características del uso de marcadores microsatélites es que se puede realizar análisis filogenéticos para ver si dos especies morfológicas de *Phaseolus vulgaris* forman agrupaciones genéticas distintas o si existe un flujo continuo de genes entre ellos (Lagostina & Andreev, 2018), ya que permite realizar estimaciones de variabilidad genética directamente con el ADN (Genetics and Molecular Research, 2011). Los marcadores SSR son multialélicos y codominantes, ideales para el mapeo de genes, estudios de ligamiento y protección de variedades (Genetics and Molecular Research, 2010). Estos estudios de diversidad genética han sido de gran importancia para los agricultores ya que existen programas de mejoramiento genético que aumentan la probabilidad de obtener genotipos superiores en la progenie (Bragantia, 2008).

2.5. Secuenciación

2.5.1. Características Generales de la Secuenciación

La secuenciación es una técnica de gran importancia, ya que comprende el rol de los genes y a la vez explora la diversidad genética natural o inducida de un organismo, con base en el ordenamiento de sus bases nitrogenadas. Estudios previos han demostrado que es una técnica eficaz, permite explorar la variabilidad de las especies como es el caso de *Arabidopsis thaliana*, también impulso el camino de la secuenciación a otros genomas de plantas como: soja, fréjol, maíz, arroz, yuca, etc. Las técnicas de secuenciación, en otros genomas de plantas, presentaron estructuras genómicas más complejas en comparación con otros organismos modelos, por lo que se requiere nuevas estrategias y herramientas para la interpretación del genoma (Trends in Plant Science, 2011).

Los avances en la tecnología de secuenciación han ido incrementando de una manera acelerada, lo que ha permitido generar nuevos conocimientos sobre la domesticación, mejora de cultivos y la evolución (The Plant Journal, 2018). Los polimorfismos de un solo nucleótido también conocidos como SNPs, son componentes importantes en la diversidad genómica de los cultivos y pueden generar conjuntos reproducibles (Varshney & Terauchi, 2014). Una de las ventajas de los SNPs es que tienen precisión y consistencia de los datos generados (Thomson, 2014), lo que los hace más reproducibles que otros enfoques de genotipado (Plant Biotechnology Journal, 2017). Los datos de los marcadores SNP son de análisis rápido y se pueden asociar directamente con el software y las líneas de reproducción con diferentes historiales evolutivos y probando la hipótesis que están relacionadas con las deleciones e introgresiones (Wang & Wang, 2015).

3. CAPITULO III. PROCEDIMIENTOS

3.1. Obtención del Material Vegetal

El material vegetal utilizado forma parte de una colección personal de un investigador. Se utilizaron semillas de varias especies distintas con características intermedias, entre las cuales se supone se utilizaron 80 accesiones. Adicionalmente se incluyeron ADNs de otras colecciones utilizadas en los estudios previos reportados en los antecedentes.

3.2. Recepción y Germinación de las Muestras

Una vez recibido el material, se clasificó, codificó y evaluó a cada una de las accesiones. En el (Anexo A) se detallan algunas particularidades de los materiales, así como sus fotos en el (Anexo B). Cada planta con cada fenotipo fue cultivada en bandejas de germinación de plástico, con su respectiva identificación "MS" (M corresponde a la identificación del agricultor y S a número materiales que dispone el agricultor). Una vez que germinaron la mayoría de las plantas, se colectaron para la extracción.

3.3. Aislamiento de Ácido nucleicos de ADN

3.3.1. Preparación de Soluciones de Extracción

Para la extracción de ADN de *Phaseolus vulgaris*, y *Phaseolus coccineus*, se utilizó el protocolo de (Colombo et al., 1998, pp.105-113) modificado, a partir de primordios foliares u hojas jóvenes. En la Tabla 1 se describe cada uno de los componentes de la solución tampón de extracción en un volumen final de 100 mL.

Tabla 1.

Componentes de la solución tampón de extracción del protocolo de extracción de ADN para (Phaseolus vulgaris y Phaseolus coccineus) en un volumen de 100mL.

Componentes	Cantidad	Concentración Final
Tris HCl 1 M pH 8	5 mL	50 mM
NaCl 5 M	20 mL	1 M
EDTA 0.5 M pH 8	4 mL	20 mM
CTAB	1 g	1%
PVP	1 g	1%

Tomado de (Colombo et al., 1998, pp.105-113)

3.3.2. Protocolo de Extracción de ADN

El ADN se extrajo del primordio foliar u hoja joven según corresponda. Un día antes de realizar la extracción de ADN, se colocó el mortero y el pistilo en congelación a -80 °C. Para la extracción de ADN se utilizaron de 1 a 3 primordios foliares o a su vez una hoja joven. Se colocó el tejido en el mortero y con nitrógeno líquido se homogeneizó, para luego colocarlo en un microtubo de 1.5 mL con 200 µL de solución tampón de extracción sobre hielo en un bloque refrigerador. Luego, se añadieron 100 mg de metabisulfito de sodio en cada microtubo de 1.5 mL. Seguido, se completó el volumen de cada tubo con 800 µL de solución tampón de extracción y se adicionaron 12 µL de b-

mercaptoetanol. Cada muestra se mezcló en el vórtex y se incubó a 60 °C en baño maría por 1:30 horas con agitación cada 30 minutos. Al finalizar la etapa de incubación, se centrifugaron las muestras a 14000 rpm por 10 minutos. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se añadieron 750 µL de CIA (Cloroformo-Alcohol-Isoamílico 24:1). Cada muestra se agitó en el vórtex y luego se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo. Nuevamente se añadieron 750 µL de CIA (Cloroformo-Alcohol-Isoamílico), se agitó en el vórtex y se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos. Luego el sobrenadante se recuperó y se transfirió en un tubo nuevo. Posterior a ello, se añadieron 500 µL de isopropanol y se incubaron las muestras a -20°C por 1 hora. Luego, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos, se desechó el sobrenadante para obtener el *pellet* de ADN. El *pellet* se lavó dos veces con etanol al 70%. Finalmente, se secó el ADN en el centrifugador de vacío por 40 minutos, para luego resuspender el *pellet* de ADN en 100 µL tampón TE con 2 µL de RNAsa. Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

3.4. Cuantificación y Dilución de ADN

El ADN se cuantificó en el espectrofotómetro EPOCH™ (Biotek®, Estados Unidos), con el kit *Taken 3* (BioTek Instruments, Inc., Estados Unidos) y el software GEN 5 (BioTek Instruments, Inc., Estados Unidos). Para la cuantificación se colocaron 2 µL en cada pocillo del kit *Taken 3*. Al determinar la concentración de ADN de cada extracción se diluyeron las muestras con agua ultra pura para obtener una concentración final en todas las muestras de 100 ng/µL en un volumen de 100 µL de agua ultra pura.

3.5. Validación de ADN

Para verificar su calidad, el ADN extraído de todas las muestras se validó realizando una amplificación, utilizando primers para el SSR BM 154, reportado por (Gaitán-Solís & Tohme, 2002). Las características de los cebadores se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2.

Características del cebador BM 154

SSR	5' TO 3'	SECUENCIA PRIMER	TAMAÑO	Tm(°C)
BM 154	FORWARD	TCTTGCGACCGAGCTTCTCC	188-248	50
	REVERSE	CTGAATCTGAGGAACGATGACCAG		

Tomado de (Gaitán, 2002, pp.2128-2136).

Las muestras de ADN fueron amplificadas con el cebador BM 154 con una reacción PCR, empleando el coctel de amplificación y el programa en el termociclador que se muestra en el (Anexo C). Los productos amplificados fueron observados en geles de agarosa al 2% con tampón TAE 1X y un marcador de peso *Track-it* 100 bp (Thermofisher, Estados Unidos). La electroforesis se llevó a cabo a 100 Voltios durante 35 minutos para luego ser revelada en el fotodocumentador Enduro TM GDS (Labnet Gel Documentation System, Estados Unidos).

3.6. Validación de los oligos extendidos

Se realizó la validación de seis marcadores de introgresión. Para esto se realizaron pruebas de amplificación con los juegos de cebadores diseñados. En este proceso se verificaron las temperaturas de *annealing* más óptimas, en un rango de 50 °C a 57 °C, al igual que las concentraciones apropiadas de cada uno de los componentes del coctel de amplificación, [MgCl₂], [dNTPs], [cebadores] (Tabla 3). Para esto se utilizaron dos muestras validadas y un control negativo. Las muestras de ADN fueron amplificadas con los cebadores diseñados (BM160, BM183, BM156), con una reacción PCR empleando el coctel de amplificación y el programa en el termociclador que se muestra en el (Anexo D).

Los productos amplificados fueron observados en geles de agarosa al 2% con tampón TAE 1X y con un marcador de peso *Track-it* 100 bp (Thermofisher, Estados Unidos). La electroforesis se llevó a cabo a 100 Voltios durante 35 minutos para luego ser revelado en el fotodocumentador Enduro TM GDS (Labnet Gel Documentation System, Estados Unidos).

Tabla 3.

Secuencia, Tamaño y temperatura de alineamiento de los cebadores de introgresión

MARCADORES	5'-3'	SECUENCIA PRIMER	TAMAÑO	Tm °C
BM 160	F	GTTGAAGTGGAAGGATGCAGA	970	57
	R	TGTTGATTGGGCCATAATGA		
BM 183	F	TCCATTTTATGACACGTGCTCA	898	53
	R	GCAATCACCATGGCAAGAAA		
BM 156	F	CAGAATTTCAATGTCTCGAGGCT	966	55
	R	CATGGTTCGGGAAATCGCAA		

Tomado de (Gaitán, 2002, pp.2128-2136).

Paralelamente, para la selección de ADNs, se realizó la verificación de genotipos en el equipo LI-COR 4300S (LICOR, inc., Estados Unidos) de los alelos obtenidos en estudios previos (Datos no publicados).

3.7. Secuenciación de alelos SSR

Una vez validada la gama alélica de los datos genotípicos de los trabajos previos, con sus respectivos alelos para los tres loci SSR, estos fueron secuenciados. Adicionalmente, se incluyeron los alelos amplificados con los nuevos oligos en los materiales considerados "intermedios", y de las especies de *P. lunatus*, *P. polyanthus*, *P. coccineus*, *P. acutifolius*. (Anexo A), de manera que esta diversidad pueda ser incluida en la filogenia.

3.8. Clonación

A partir de las muestras heterocigotas obtenidas del genotipaje en LICOR de los locus BM160, BM183, BM156, se realizó un *pool* de muestras, con base en los tamaños de los fragmentos, así como su locus (Tabla 4).

Tabla 4.

Muestras seleccionadas para cada marcador validando la variación de pesos en los alelos

	ADN	LOCUS	SIZE	ALELOS
GRUPO 1	13_J_C	160	970	184/210
	M12S3	160	970	228/240
	47_J_C	160	970	234/246
GRUPO 2	COC2	160	970	182/184
	COC2	183	598	132/140
	125_J_C	160	970	212/242
GRUPO 3	167_J_S	160	970	182/148
	F55P1	183	898	148/160
	C3	156	966	202/222
GRUPO 4	S3	156	966	206/222
	F4P2	156	966	280/284
	157_J_S	160	970	184/250

Las muestras de la tabla 4 se amplificaron con sus respectivos marcadores (BM160, BM183, BM156) siguiendo el mix y el programa de amplificación del (Anexo D). Posteriormente se realizó la electroforesis en geles de agarosa al 2% con tampón TAE 1X para luego ser revelados en el fotodocumentador Enduro TM GDS Labnet (Gel Documentation System, Estados Unidos). Finalmente se procedió a realizar la clonación y los fragmentos amplificados fueron purificados con el kit Wizard[®]SV Gel and PCR Clean- Up System (Promega).

Una vez purificadas las muestras se cuantificaron las mismas utilizando el espectrofotómetro EPOCH[™] de Biotek[®], Estados Unidos, con el kit *Taken 3* y el software GEN 5. Para la cuantificación se colocaron 2 µL en cada pocillo del kit *Taken 3*. Al determinar la concentración de ADN de cada extracción se procedió a diluir con agua ultra pura a una concentración final de 30 ng/µl en 20 µl de agua ultra pura.

Paralelamente, para el proceso de transformación, se elaboraron medios de cultivo LB con agar, 25 µg/mL de ampicilina. Los medios se dispensaron en

cajas Petri y una vez solidificados, se añadieron 20 μL XGAL y 100 μL de IPTG.

Para la transformación, se agregaron 5 μL del mix de la reacción de ligación (Anexo E) a un tubo estéril de 1,5 mL sobre un bloque de refrigeración. Posteriormente, se descongelaron las células competentes para después agregar 50 μL de células a cada reacción de ligación, Las células se incubaron en hielo por 20 minutos, se calentaron las células a 45-50 s en baño maría a 42 °C. Inmediatamente se devolvieron los tubos al hielo por dos minutos se colocaron 950 μL de medio SOC a cada uno de los tubos con células transformadas y se incubaron por una hora y 30 minutos a 37 °C con agitación. Una vez terminado el tiempo establecido, se plaquearon las muestras en las cajas petri con medio LB con ampicilina, XGAL e IPTG y se incubaron toda la noche a 37 °C. Después del tiempo de incubación, se seleccionaron colonias blancas y un par de azules como control. A partir de las colonias blancas, se realizó una PCR con los cebadores SSRSP6-T7 (Tabla 5). El mix y el programa de amplificación para la validación de las bacterias clonadas se muestran en el (Anexo F).

Tabla 5
Características del cebador SP6-T7.

MARCADOR	5' to 3''	Secuencia primer	Tm (°C)
SP6-T7	F	ATTTAGGTGACACTATAG	46
	R	TAATACGACTCACTATAGGG	

Los productos amplificados fueron observados en geles de agarosa al 2 % con tampón TAE 1X y un *Track-it* 100 bp. La electroforesis se llevó a cabo a 100 Voltios durante 35 minutos para luego ser revelado en el fotodocumentador Enduro TM GDS Labnet (Gel Documentation System, Estados Unidos). Al finalizar la visualización, las bacterias que presentaron el fragmento de interés se las replicó en medio LB a 37 °C por 18 horas. Seguido, se realizó la

extracción de ADN de la bacteria siguiendo el kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System, para reamplificar SSRSP6-T7 y secuenciar.

3.9. Cladogramas de la Gama Alélica por marcador

Se realizó un cladograma de los tres marcadores en estudio BM156, BM160, BM 183 con su respectiva gama alélica, para representar el parentesco evolutivo entre especies a un árbol genealógico. El método de *Neighbor joining* (Saitou y Nei, 1987) fue utilizado en las filogenias a partir de secuencias.

3.10. Secuenciación

Se realizaron tres repeticiones de las reacciones de reamplificación. Posteriormente se concentró el ADN y se dispensaron 15 µL en tubos de 0,2 mL respectivamente etiquetados, como alícuota. Las muestras fueron enviadas al Servicio de Secuenciación de la Universidad de las Américas UDLA (Quito, Ecuador), donde se purificó y secuenció a través de la técnica Sanger automatizada. Para calcular el porcentaje de polimorfismo se utilizó la siguiente formula.

$$\%polimorfismo = \frac{\#mutación}{\#posición} * 100\%$$

3.11. Análisis Filogenético de las secuencias flanqueantes de los microsatélites

Las secuencias obtenidas fueron analizadas por el programa BioEdit (Hall, 2005), para alinear y ensamblar las secuencias. Una vez terminadas todas las secuencias, se exportaron los datos en formato .txt al programa estadístico MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetycs Analysis*). Se suprimieron los *motif* de los microsatélites, con el objetivo de analizar las secuencias flanqueantes. Con estos datos, se construyeron arboles filogenéticos con el método de Máxima Parsimonia (Tamura, 2013), con un *Boostrap* de 1000 réplicas para cada uno de los marcadores analizados (BM160, BM183, BM156).

4. CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estudio Molecular

4.1.1. Extracción de ADN

Las extracciones de ADN de las 80 accesiones presentaron un resultado óptimo. En la corrida electroforética del ADN las muestras presentaron una leve degradación en los carriles (1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10,11) (Figura 1).

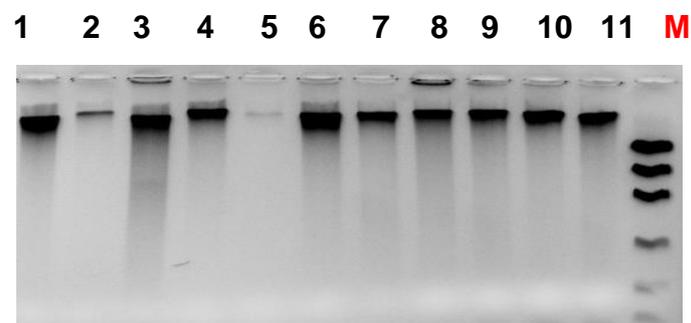


Figura 1. Extracción de ADN

Tomado de (Colombo et al., 1998, pp.105-113)

En el carril 12 está el marcador de 100 bp y el de ADN genómico de las muestras tienen una concentración de 100ng/uL.

El método de (Colombo et al.,1998, pp.105-113) consiste en obtener ácidos nucleicos purificados a partir de diversas fuentes vegetales. La calidad y la pureza del ADN son elementos importantes para el análisis de la biología molecular y las técnicas de recombinación del ADN, evitando así que contengan contaminantes inhibidores de procesos posteriores. En las investigaciones anteriores se utilizó este método debido a los buenos resultados obtenidos; el proceso de extracción es corto, rentable y económico. Es utilizado en variedades como yuca, cacao y fréjol. Una de las limitaciones de este protocolo es que solamente puede ser utilizado en muestra fresca.

4.1.2. Validación del ADN extraído

Las muestras extraídas y las muestras tomadas de estudios previos se amplificaron con los primers SSR BM154. El marcador BM154 es un microsatélite con un tamaño de 188-248 bp. Se seleccionó este marcador para validar el ADN debido a que en un estudio previo se observó una amplificación total de las muestras con bandas de calidad aceptable. La temperatura de *annealing* empleada fue de 50°C y el programa en el Termociclador es de 5 min a 94°C, 30 ciclos (45s a 94°C, 1 min a 50°C, 2 min a 72°C) 7 min a 72°C y 10 min a 10°C (Figura 2).

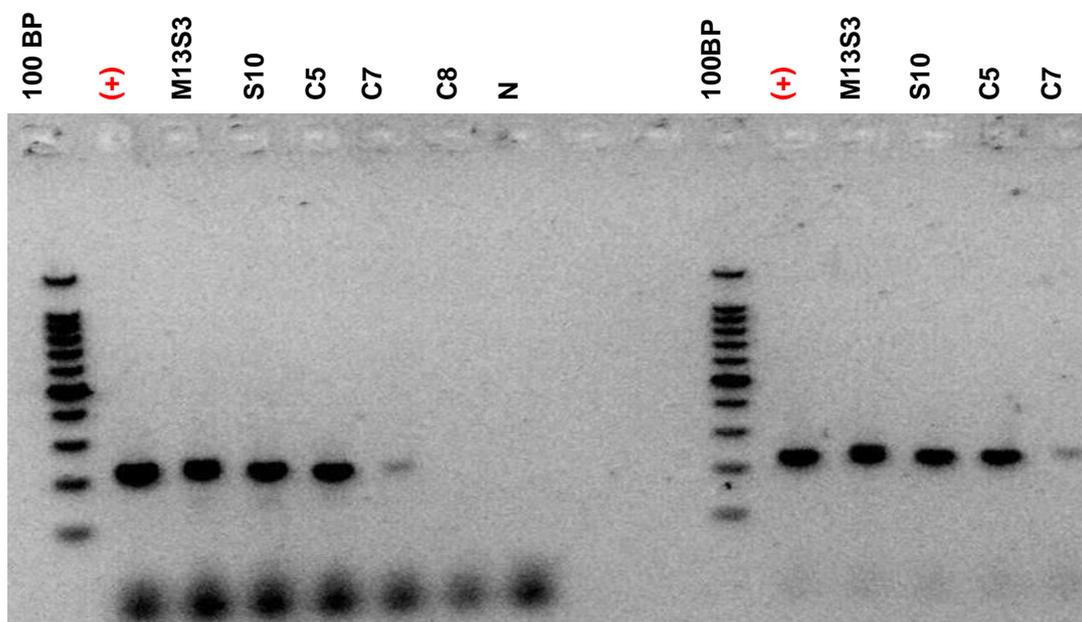


Figura 2. Productos Amplificados con el marcador BM 154 en algunas muestras seleccionadas al azar.

Con este procedimiento se pudo determinar que la calidad de ADN era óptima para un análisis molecular, por lo que se procedió a validar los marcadores de introgresión por PCR.

4.1.3. Validación de los marcadores de introgresión por PCR

De las pruebas de amplificación con los juegos de cebadores diseñados, se seleccionaron tres marcadores para este estudio (BM156, BM183, BM160). La validación de los marcadores extendidos consistió en una PCR, en donde se usaron las accesiones 6_J_C, 23_J_C, seleccionadas al azar y un control negativo para la prueba de todos los marcadores. El programa en el termociclador fue de 5 min a 94°C, 34 ciclos (1 min a 94°C, 1.3 min a la temperatura de *Annealing* (Figura 3), 2.3 min a 72°C), 10 min a 72°C, 10 min a 10°C.

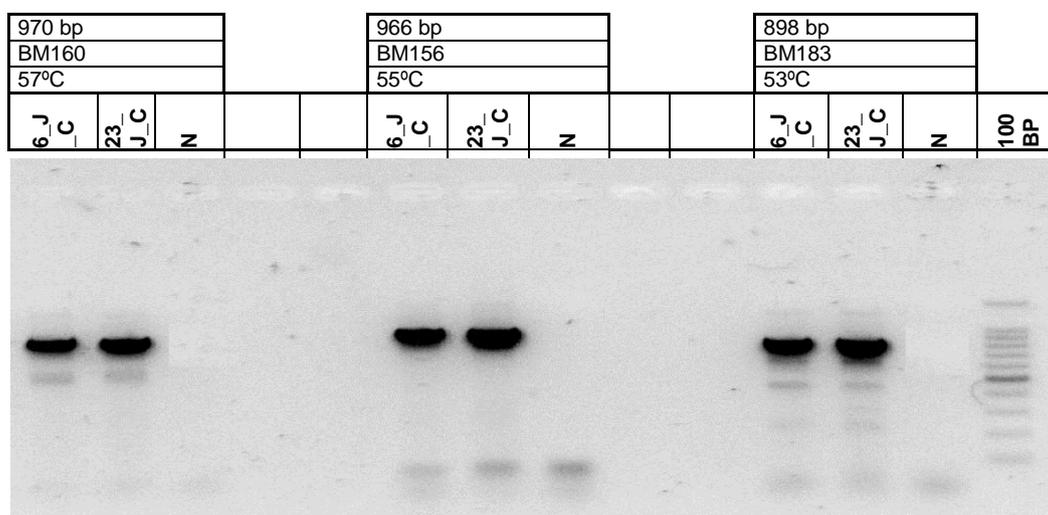


Figura 3. Validación de los marcadores BM 160, BM 183, BM 156. Marcador molecular: 100bp

De los seis marcadores planteados para este estudio, solamente se utilizaron tres marcadores debido a que los marcadores BM211 y BM 164 no amplificaron y el BM 154 no presentó variabilidad en las muestras

4.1.4. Validación de las muestras con los marcadores de introgresión por PCR

Las muestras extraídas y las muestras tomadas de investigaciones previas fueron validadas por PCR con los nuevos marcadores de introgresión BM 160, BM 183, BM 156, con las temperaturas de *annealing* de 57° C, 53°C y 55°C, respectivamente y el programa del termociclador fue: 5 min a 94°C, 34 ciclos (1 min a 94°C, 1,3 min ta a, 2,3 min a 72°C), 10 min a 72°C, 10 min a 10°C (Figura 4, 5 y 6).

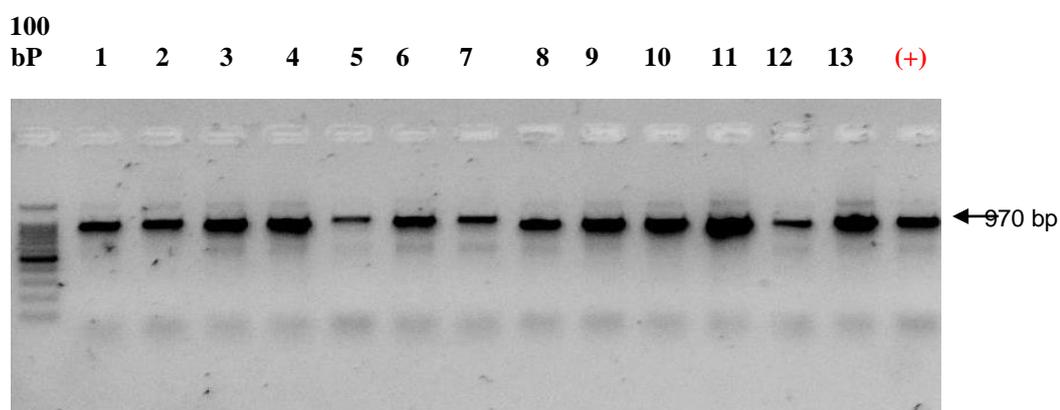


Figura 4. Validación de las muestras obtenidas de la gama alélica del Marcador BM 160.

El tamaño de producto esperado es de aproximadamente 970 bp. Marcador de peso: 100 bp.

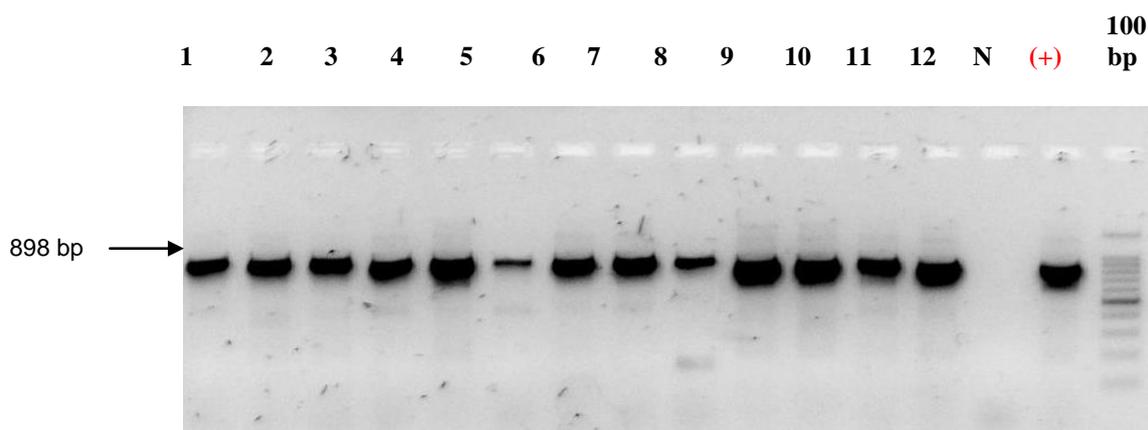


Figura 5. Validación de las muestras obtenidas de la gama alélica del Marcador BM 183.

El tamaño de producto esperado es de aproximadamente 898 bp. Marcador de peso: 100 bp

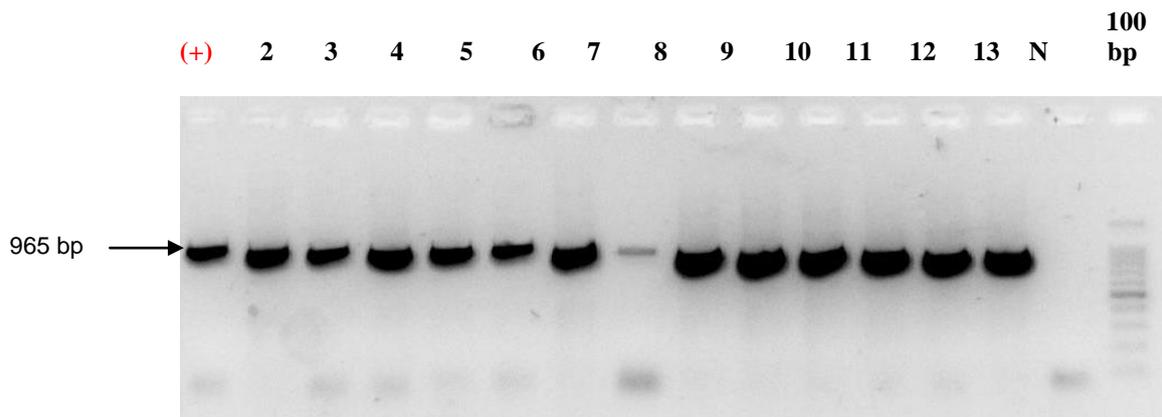


Figura 6. Validación de las muestras obtenidas de la gama alélica del Marcador BM 156.

El tamaño de producto esperado es de aproximadamente 965 bp. Marcador de peso: 100 bp

Paralelamente, los ADN de las muestras se validaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en el LI-COR 4300S. Mediante este *screening*, se identificaron los genotipos que representan la gama alélica de cada locus SSR seleccionado en el estudio (Figura 7). El genotipado de las accesiones de Cotacachi, Saraguro, Mesoamericanos y Fenotipos seleccionados se encuentra en el (Anexo G).

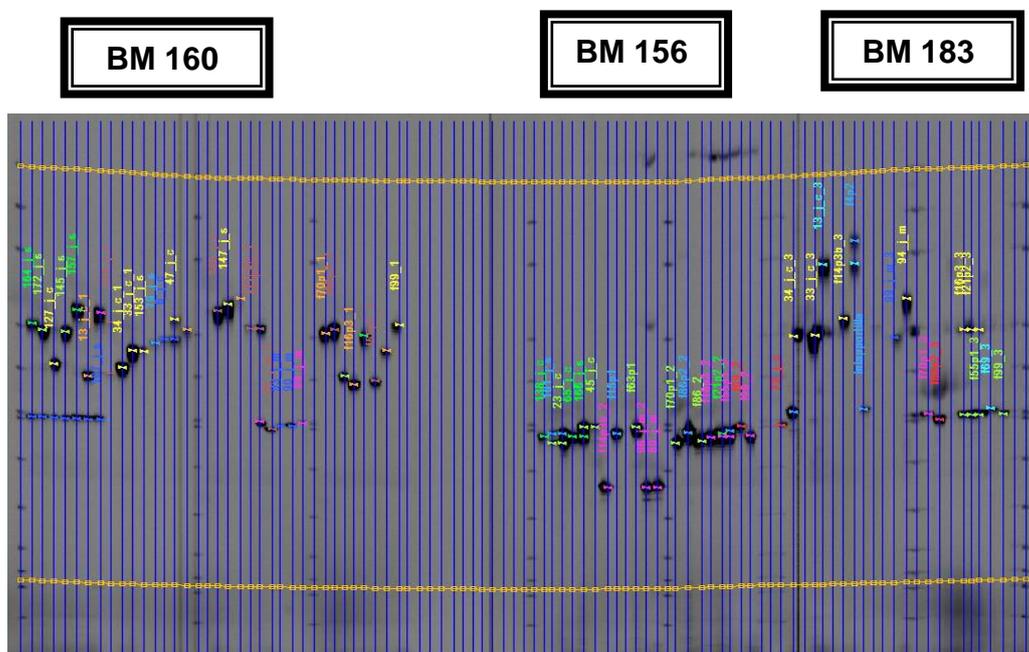


Figura 7. Validación de la gama alélica de ADN seleccionados para tres de los loci SSR analizadoBs.

Con los resultados obtenidos del LI-COR 4300S se seleccionaron ADNs para representar la gama alélica de cada uno de los marcadores utilizados en esta investigación

En la Tabla 6 se detalla la gama alélica del marcador BM 156; los alelos de interés para este marcador son el 202, 214, 220, 222, 224. Las muestras en negrilla son las que se secuenciaron y se incluyeron en la filogenia; las muestras con asterisco (*) son las que se clonaron.

Tabla 6.

ADNs seleccionados para secuenciación de la gama alélica del locus BM156

Marcador SSR BM156		
Alelos (bp)*	Accesiones Mesoamericanas**	Accesiones Andinas***
202	-	F64
204	-	Acu 1
206	-	Coc1
		M7S2
214	90_J_M	-
220	100_J_M	-
222	-	M5S3B
224	-	57_J_C
234	-	Pol2
260	-	56_J_C
262	-	64_J_C
266	-	F63P1
270	-	25_J_C
274	-	2_J_C
276	-	13_J_C
278	-	F4P2*
		36_J_C
280	-	11_J_C
282	-	F4P2*
		155_J_S
294	-	7_J_C

Nota: * Alelo introgresado; Normal: Alelo Nativo. ** Secuenciadas y Filogenia. *** Negrita: Secuenciada y Filogenia; Asterisco y Negrita: Clonadas, Secuenciadas y Filogenia; Asterisco: Clonadas; Blanco y verde: Accesiones de trabajos anteriores; Amarillo: Trabajo actual.

En la Tabla 7 se observa la gama alélica del marcador BM 160; los alelos correspondientes para este marcador son el 182, 184, 186. Las muestras con negrilla son las que se secuenciaron y se incluyeron en la filogenia; las muestras con asterisco (*) son los que se clonaron

Tabla 7.

ADNs seleccionados para secuenciación de la gama alélica del locus BM160

Marcador SSR BM160		
Alelos (bp)*	Accesiones Mesoamericanas**	Accesiones Andinas***
182	96_J_M	-
184	90_J_M	13_J_C*
	93_J_M	-
186	99_J_M	ACU1
191	-	POL2
210	-	13_J_C*
228	-	33_J_C
234	-	47_J_C*
238	-	102_J_C
246	-	47_J_C*
252	-	148_J_S
256	-	147_J_S

Nota: * Alelo introgresado; Normal: Alelo Nativo. ** Secuenciadas y Filogenia. *** Negrita: Secuenciada y Filogenia; Asterisco y Negrita: Clonadas, Secuenciadas y Filogenia; Asterisco: Clonadas; Blanco y verde: Accesiones de trabajos anteriores; Amarillo: Trabajo actual.

En la Tabla 8 se observa la gama alélica del marcador BM 183; las muestras señaladas con asterisco (*) son las que se clonaron y las muestras con negrilla son las que se secuenciaron y se incluyeron en la filogenia.

Tabla 8.

ADNs seleccionados para secuenciación de la gama alélica del locus BM183

Marcador SSR BM183		
Alelos (bp)*	Accesiones Mesoamericanas**	Accesiones Andinas***
130	-	POL 2
		M7S2
		COC1
		S3
132	-	coc2*
140	-	coc2*
142	-	C3
144	89_J_M	-
146	-	F11P5
148	-	F55P1*
150	-	3_J_C
156	-	ACU1
158	94_J_M	-
160	-	F55P1*
		67_J_C
162	-	154_J_S
		4_J_C
164	-	124_J_C
		M15S2

Nota: * Alelo introgresado; Normal: Alelo Nativo. ** Secuenciadas y Filogenia. *** Secuenciada y Filogenia; Asterisco y Negrita: Clonadas, Secuenciadas y Filogenia; Asterisco: Clonadas; Blanco y verde: Accesiones de trabajos anteriores; Amarillo: Trabajo actual.

4.2. Clonación de alelos heterocigotas

De las 890 colonias analizadas por cada ligación, 71 colonias correspondieron a bacterias con el fragmento clonado. De estas 71 colonias, cuatro se secuenciaron y se incluyeron en la filogenia.

El polimorfismo de las muestras clonadas refleja la historia y la domesticación del fréjol común como es el caso del marcador BM160 con las muestras

13_J_C-210 y 47_J_C-234, las cuales tienen un mismo origen de agrupación con las muestras mesoamericanas obtenidas de la Filogenia.

El fréjol común como la cebada y *Arabidopsis* presentan una diversidad media de nucleótidos incluso más baja que el maíz; lo que representa la presión de un nivel relativamente alto de mutaciones ligeramente perjudiciales (Blair, 2006). En el estudio realizado por (Mol Breeding, 2010; Theoretical and Applied Genetics, 2014), se puede observar que utilizan la técnica de clonación y analizan la diversidad genética de un nuevo gen P5C5 del fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) obteniendo como resultado que los polimorfismos de un solo nucleótido del gen PvP5CS2 pueden agrupar muestras andinas y mesoamericanas entre sí y que las secuencias de accesiones del mismo origen de agrupación tuvieron sustituciones de nucleótidos similares.

4.3. Cladogramas de los marcadores de introgresión

Cladogramas de los marcadores BM156, BM160, BM183 con su respectivo árbol genealógico que comparten un mismo ancestro común (Figura 8, 9 y 10). En la Figura 8 se observa el cladograma del marcador BM156, que muestra que todas las muestras tienen un ancestro común, el grupo externo (*P. Lunatus*) está bien separado de las demás especies. Junto a la línea del cladograma se notan cuadros (Mesoamericano y Andino) que señalan las características compartidas. Las muestras que están más relacionadas con las colecciones mesoamericanas son: 57_J_C, M5S3B, F64; las demás tienen alelos andinos y se dispersan en el cladograma, al final de la línea del cladograma se muestran las colecciones de *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *P. polyanthus*.

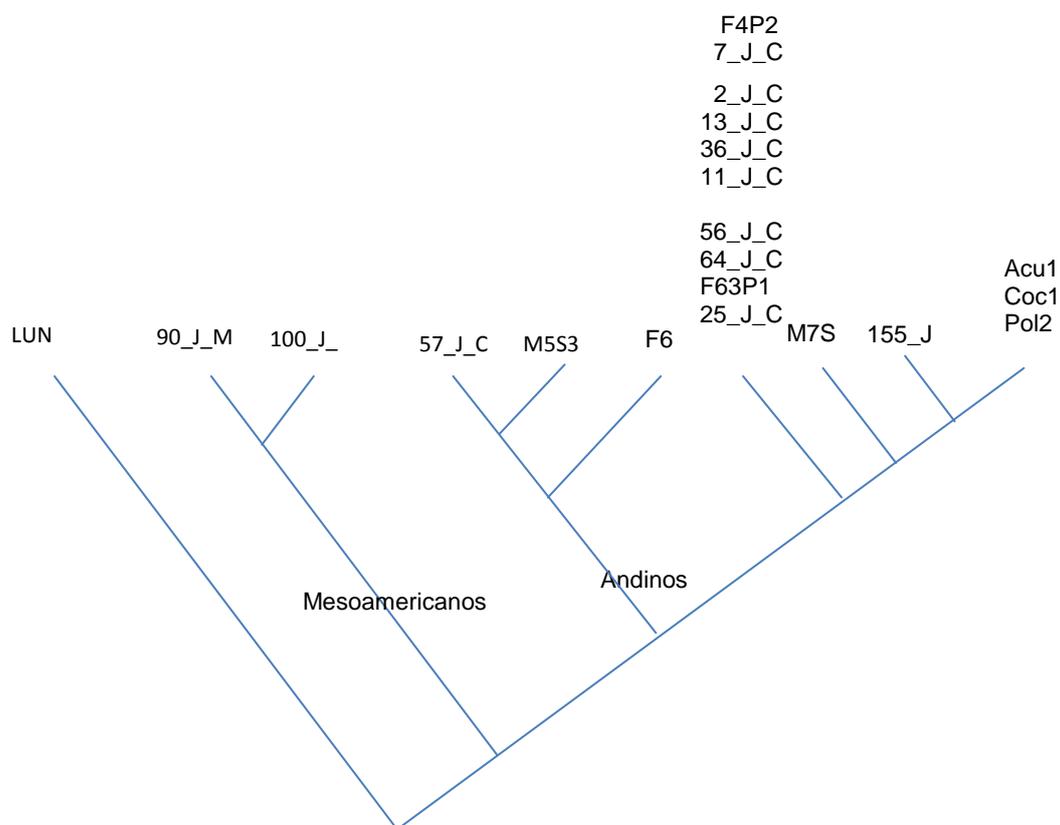


Figura 8. Cladograma del marcador BM156

En la Figura 9 se observa el cladograma del marcador BM160, que muestra que todas las muestras tienen un ancestro común, el grupo externo (*P. Lunatus*) está bien separado de las demás especies. Junto a la línea del cladograma se notan cuadros (Mesoamericano y Andino) que señalan las características compartidas. Las muestras que están más relacionadas con las colecciones mesoamericanas son: ACU 1, 13_J_C; las demás muestras incluida la accesión 13_J_C tienen alelos andinos y se dispersan en el cladograma, al final de la línea del cladograma se encuentra la accesión de *P. polyanthus*.

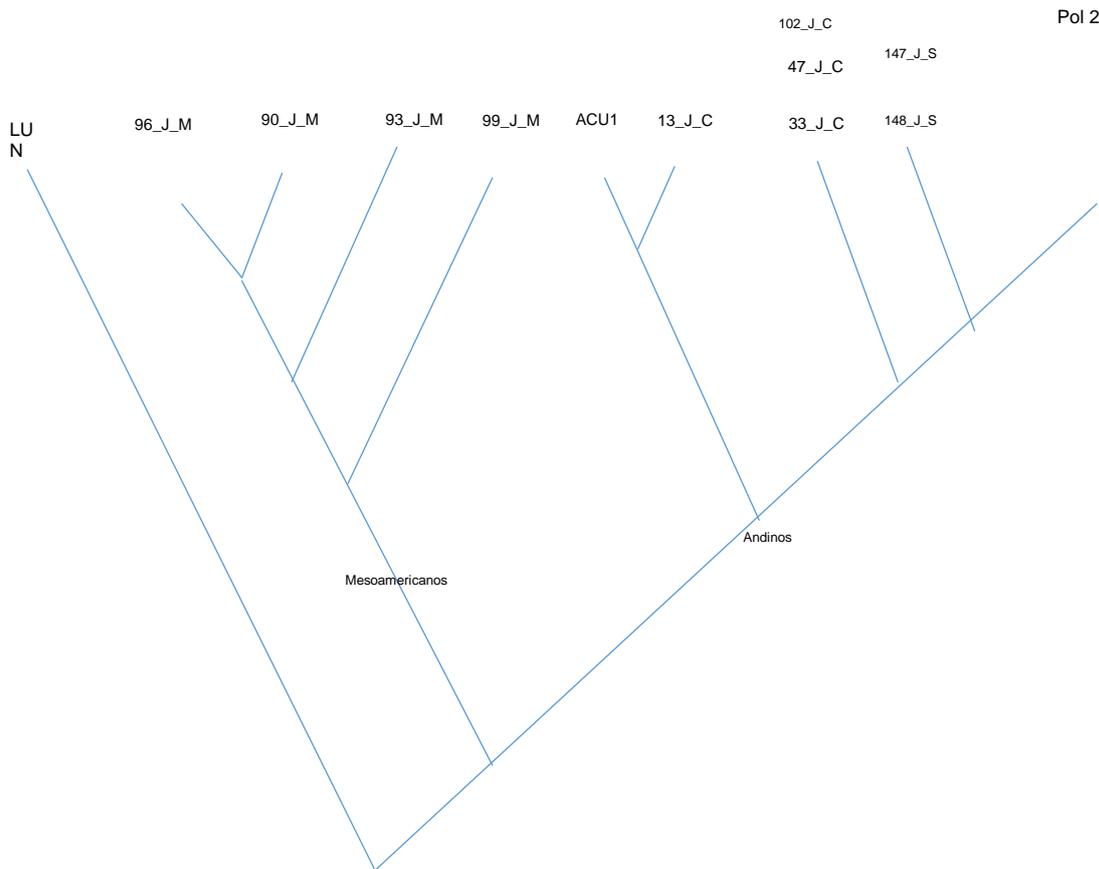


Figura 9. Cladograma del marcador BM160

En la Figura 10 se observa el cladograma del marcador BM183, que muestra que todas las muestras tienen un ancestro común, el grupo externo (*P. Lunatus*) está bien separado de las demás especies. Junto a la línea del cladograma se notan cuadros (Mesoamericano y Andino) que señalan las características compartidas. Este es un marcador control, las muestras no tienen relación tanto mesoamericanas y andinas, se dispersan en el cladograma, al final de la línea del cladograma se encuentra la accesión de *P. polyanthus*.

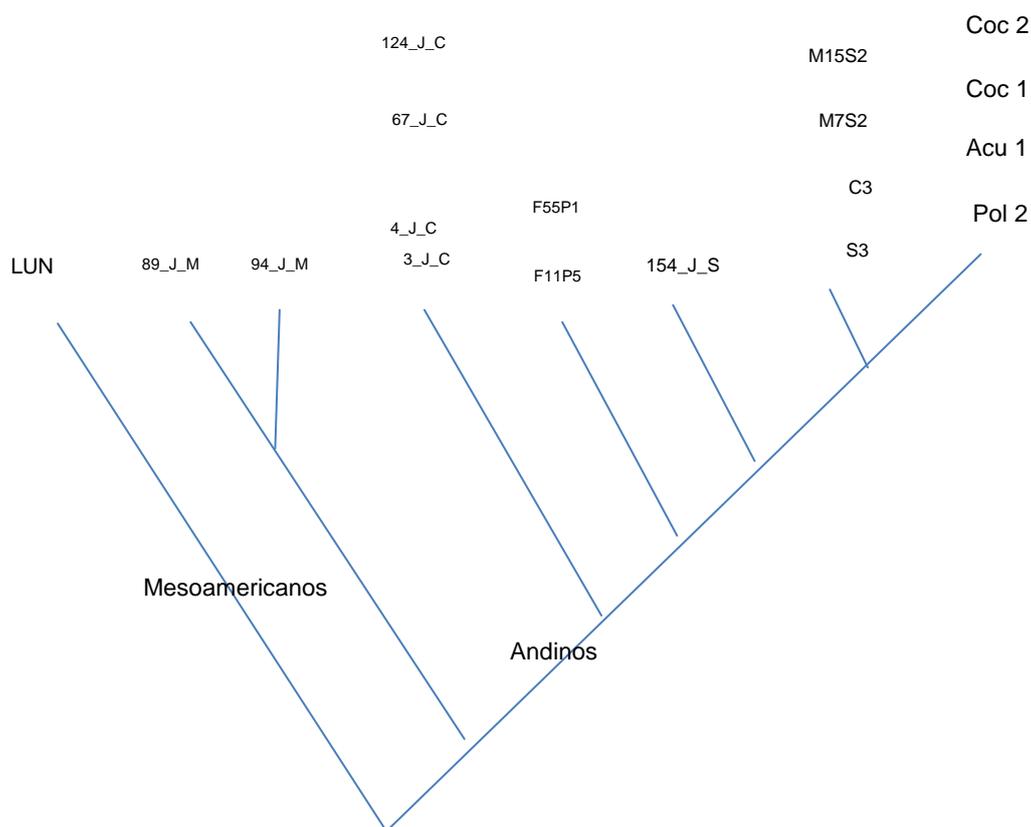


Figura 10. Cladograma del marcador BM183.

Los Cladogramas de las Figuras 8, 9 y 10 indican que todas las accesiones de los marcadores BM156, BM160, BM183 parten de un ancestro común y se dispersan del grupo externo (*Phaseolus lunatus*). En este estudio se consideraron varios argumentos contra un enfoque genético, ya que no existen poblaciones o linajes ancestrales vivos, debido a que con el paso del tiempo cada una de las variedades de *Phaseolus vulgaris* L. ha tenido el mismo periodo de evolución desde su divergencia (Cortés, 2013). Por lo tanto, en ausencia de información, no será posible reconstruir caracteres ancestrales, ni identificar alelos ancestrales. Esto podría deberse a una clasificación incompleta del linaje del polimorfismo ancestral, sino a la homoplasia o la introgresión ancestral (Baum, 2005). Por consiguiente, sigue en cuestión la hipótesis de si realmente existe introgresión o no en las accesiones mesoamericanas y andinas. (Cortés & Blair, 2011). Sin embargo, la

información proporcionada por estos Cladogramas en este estudio, es insuficiente para respaldar una hipótesis, razón por la cual se analizó la secuencia flanqueante al microsatélite

4.4. Secuenciación y Filogenia

A partir de los productos de PCR obtenidos de las muestras detalladas en las Tablas 6, 7 y 8, para el marcador BM 160 se obtuvieron 13 secuencias; para el marcador BM 183 se obtuvieron 17 secuencias y de igual manera el marcador BM 156 se obtuvieron 17 secuencias.

Las secuencias obtenidas mostraron la variabilidad genética de los dos agroecosistemas de Cotacachi y Saraguro con los acervos mesoamericanos y las muestras de *Phaseolus coccineus*, *polyanthus* y *acutifolius*. En la Figura 11 se observa el número de mutaciones puntuales de las regiones flanqueantes colindantes de los 17 alelos secuenciados del locus BM156. Se detectaron 24 mutaciones puntuales, de las cuales 18 son exclusivas de un solo alelo, y seis son compartidos entre dos o más alelos. El porcentaje de polimorfismo es de 3,63%.

Muestras	Alelos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
F64	202	C	C	A	A	T	C	C	T	T	T	C	N	T	G	A	T	G	G	G	T	T	A	G	G	
Acu 1	204	C	C	A	A	T	C	C	T	T	T	C	N	T	G	A	T	G	G	G	T	T	A	G	G	
Coc 1	206	C	T	T	G	T	C	A	T	T	T	C	C	G	T	G	A	A	G	G	A	T	T	G	A	G
M7S2	206	C	C	A	A	T	C	A	T	T	T	C	G	T	G	A	T	G	A	G	T	C	A	G	A	
90_J_M	214	G	C	A	A	T	T	C	C	T	T	C	G	T	G	C	T	G	A	G	A	C	A	G	G	
100_J_M	220	C	C	A	A	T	C	C	T	T	T	C	G	T	G	A	T	T	G	G	T	T	A	G	G	
M5S3B	222	C	C	A	A	T	C	C	T	T	T	C	G	T	G	A	T	G	G	G	T	T	A	G	G	
Pol2	234	G	C	A	A	C	C	C	C	T	T	C	G	T	G	A	T	G	G	G	T	T	A	G	G	
56_J_C	260	G	C	A	A	T	C	C	C	T	T	C	G	T	G	A	T	G	G	G	T	T	A	G	G	
64_J_C	262	C	C	A	A	T	C	C	T	T	T	C	A	T	G	A	T	G	G	G	T	T	A	G	G	
F63P1	266	C	C	A	A	T	C	C	T	T	T	A	A	T	G	A	T	G	G	G	T	T	A	G	G	
25_J_C	270	C	C	A	A	T	C	C	T	T	T	C	A	T	G	A	T	G	G	G	T	T	A	G	G	
2_J_C	274	C	C	A	A	T	C	C	T	C	T	C	A	A	A	A	T	G	G	G	T	T	A	G	G	
13_J_C	276	C	C	A	A	T	C	C	T	T	T	C	A	T	G	A	T	G	G	G	T	T	A	G	G	
36_J_C	278	C	C	A	A	T	C	C	T	T	T	C	A	T	G	A	T	G	G	G	T	T	A	G	G	
7_J_C	282	C	C	A	A	T	C	C	T	T	T	C	A	T	G	A	T	G	G	G	T	T	A	G	G	
155_J_S	294	C	C	A	A	T	C	C	T	T	T	C	N	T	G	A	T	G	G	G	T	T	A	G	G	

Figura 11. Mutaciones y regiones flanqueantes que presenta el Locus BM 160

En la Figura 12 se observaron el número de mutaciones puntuales de las regiones flanqueantes colindantes de 13 alelos representados del locus BM160. Se detectaron 46 mutaciones puntuales, de las cuales 26 son exclusivas de un solo alelo, y 23 son compartidas entre dos o más alelos. El porcentaje de polimorfismo es de 6.7%.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	3				
		188	189	190	191	194	203	213	235	243	250	289	297	304	305	313	320	329	343	377	405	404	463	464	483	493	495	511	520	527	529	549	555	570	473	585	606	611				
Vuesra	Alelos	A	C	A	G	A	A	T	G	G	A	C	C	A	T	T	T	T	G	A	G	G	G	A	A	C	C	A	C	C	A	G	C	C	T	A	C	T	A	G	A	G
06 J M	182	A	C	A	G	A	A	T	A	A	T	C	A	T	G	C	C	C	A	A	T	G	G	A	A	C	C	A	A	C	G	T	A	A	C	A	G	A	G	G	C	
00 J M	184	A	C	A	G	A	A	T	G	G	G	C	C	A	T	T	T	T	G	A	G	G	G	A	A	C	C	A	C	C	A	G	C	C	T	A	C	T	A	G	A	G
03 J M	184	A	C	A	G	A	A	T	G	G	A	C	C	A	G	T	C	T	G	A	C	G	G	A	A	C	C	A	C	C	A	G	C	G	T	A	A	C	A	G	G	C
09 J M	186	A	C	A	G	A	A	T	G	G	A	C	C	A	T	T	T	T	G	A	G	G	G	A	A	C	C	G	G	C	A	G	C	C	T	A	C	T	A	G	A	G
Acu 1	186	A	C	A	G	A	A	T	G	G	A	C	C	A	T	T	T	T	G	A	G	G	G	A	A	C	C	A	C	C	A	G	C	C	T	A	C	T	A	G	A	G
Pol 2	191	A	C	A	G	G	A	T	G	G	A	C	C	A	T	T	T	T	G	A	G	G	T	A	A	C	C	A	T	C	A	G	C	C	C	A	C	T	C	G	A	G
03 J C	228	A	C	A	G	G	A	T	G	G	A	C	C	A	T	T	T	T	G	A	C	T	G	A	A	C	C	A	C	C	A	G	C	C	T	A	C	T	A	G	A	G
02 J C	238	A	C	A	G	G	A	T	G	G	A	C	C	A	T	T	T	T	G	A	C	T	G	A	A	C	C	A	C	C	A	G	C	C	T	A	C	T	A	G	A	G
048 J S	252	C	A	G	A	G	G	T	G	A	A	A	C	A	T	T	T	T	G	T	C	T	G	A	A	C	A	T	C	G	A	C	C	T	A	C	C	A	G	G	C	
047 J S	256	A	C	A	G	A	A	T	G	G	A	C	C	A	T	T	T	T	G	A	G	G	G	A	A	G	C	A	T	T	G	A	G	G	T	G	C	T	A	A	G	C
L1-1	184/210	A	C	A	G	A	A	T	G	G	A	C	C	A	T	T	T	T	G	A	G	G	G	T	C	C	A	C	C	A	G	C	C	T	A	C	T	A	G	A	G	
L2-2	243/240	A	C	A	G	A	A	T	G	G	A	C	C	A	T	T	T	T	G	A	G	G	A	A	C	C	A	C	C	A	G	C	C	T	A	C	T	A	G	A	G	
L3-3	246	A	C	A	G	A	A	T	G	G	G	C	C	A	T	T	T	T	G	A	G	G	G	A	A	C	C	A	C	C	A	G	C	C	T	A	C	T	A	G	A	G

Figura 12. Mutaciones y regiones flanqueantes que presenta el Locus BM 160

En la Figura 13 se observa el número de mutaciones puntuales de las regiones flanqueantes colindantes de 17 alelos representados del locus BM183. Se detectaron 29 mutaciones puntuales, de las cuales 23 son exclusivas de un solo alelo, y solo nueve son compartidos entre dos o más alelos. El porcentaje de polimorfismo es de 4,2%

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29					
		222	243	261	278	283	291	301	343	437	439	450	469	478	496	512	517	537	543	562	564	569	570	571	588	646	656	665	686	698					
Muestras	Alelos	C	T	A	A	T	T	A	G	A	A	A	T	C	A	A	T	A	T	T	G	T	C	A	C	G	T	C	T	G	T	G	T	G	C
S3	130	C	T	A	T	T	T	A	G	A	A	G	T	C	A	A	T	A	T	T	C	T	A	G	C	G	T	C	T	G	T	G	T	G	C
Pol2	130	C	T	A	T	T	T	A	G	A	A	G	T	C	A	A	T	A	T	C	G	T	A	A	T	G	T	C	T	G	A	A	T	G	C
M7S2	130	C	T	A	T	T	T	A	G	A	A	G	T	C	A	A	T	A	T	C	G	T	A	A	T	G	T	C	T	G	A	A	T	G	C
Coc1	130	C	T	A	A	T	T	A	G	C	G	G	T	C	A	A	T	A	T	C	T	A	A	C	G	T	C	T	G	T	G	T	G	T	C
C3	142	C	T	A	A	T	T	A	G	A	G	G	T	C	A	A	T	A	T	T	C	T	A	G	C	G	T	C	T	G	T	G	T	G	T
89 J M	144	C	T	T	A	C	T	A	G	A	A	C	T	C	A	A	T	A	T	T	G	T	A	A	C	G	T	C	T	G	T	G	T	G	C
F11P5	146	C	T	A	A	T	T	A	G	A	A	T	C	A	A	T	A	T	T	G	T	C	A	C	G	T	C	T	G	T	G	T	G	C	
3 J C	150	C	T	A	A	T	T	A	G	A	A	T	C	A	A	T	A	T	T	G	T	C	A	C	G	G	T	C	G	T	G	T	G	T	C
Acu1	156	C	T	A	A	T	T	A	G	A	G	G	T	T	A	A	T	A	C	T	G	T	A	A	C	G	T	C	T	G	T	G	T	G	C
94 J M	158	C	T	A	A	T	T	A	G	A	A	T	C	A	A	T	A	T	T	G	T	C	A	C	G	T	C	T	G	T	G	T	G	C	
67 J C	160	C	T	A	A	T	T	A	G	A	A	T	C	A	A	T	A	T	T	G	T	C	A	C	G	T	C	T	G	T	G	T	G	C	
154 J S	162	C	T	A	A	T	T	A	G	A	A	T	C	A	A	T	A	T	T	G	T	C	A	C	G	T	C	T	G	T	G	T	G	C	
4 J C	162	C	T	A	A	T	T	A	G	A	A	T	C	A	A	T	A	T	T	G	T	C	A	C	G	T	C	T	G	T	G	T	G	C	
124 J C	164	C	T	A	A	T	T	A	G	A	A	T	C	A	A	T	A	T	T	G	T	C	A	C	G	T	C	T	G	T	G	T	G	C	
M15S2	164	T	C	A	A	T	A	G	C	A	A	G	G	C	G	G	A	A	T	C	G	G	A	G	C	G	T	C	T	A	T	G	C	T	C
L3-1	148/160	C	T	A	A	T	T	A	G	A	A	T	C	A	A	T	A	T	T	G	T	C	A	C	A	T	C	T	G	T	G	T	G	C	
L2-10	132/140	C	T	A	A	T	T	A	G	A	A	T	C	A	A	T	A	T	T	G	T	C	A	C	A	T	C	T	G	T	G	T	G	C	

Figura 13. Mutaciones y regiones flanqueantes que presenta el Locus BM 183

A pesar de tener secuencias conservadas flanqueantes, a una escala de secuencias genómicas en múltiples genomas de *Phaseolus*, las secuencias flanquean los loci SSR en las secuencias obtenidas por PCR (Wang y Wang, 2016). Los SSR se han caracterizado de forma exhaustiva para la mayoría de especies como son: soja, arroz, cebada, Brassica, yuca, tabaco, etc. Sin embargo, la alta ausencia de variabilidad por parte de los marcadores genera una deficiente variabilidad en las secuencias flanqueantes de una secuencia genómica completa. En el caso del tabaco se han desarrollado siete análisis de secuencia genómica del género *Nicotiana*, lo que ha hecho posible una investigación profunda de los SSR, incluyendo información de diploides, tetraploides que se encuentran relacionados estrechamente con el tabaco (BMC Genomics, 2018).

Actualmente, la evolución de los SSR se puede determinar al comparar los microsatélites y su secuencia de flaqueo, ya que muchos marcadores genómicos se han ido diseñando a partir de las secuencias que flanquean los SSR, de modo que la longitud de las extensiones diferirá en diferente genoma por marcador (Plos One, 2013). Se deben desarrollar nuevas técnicas para analizar la diversidad genética de las especies y un protocolo experimental altamente eficiente para el uso de marcadores SSR. En el estudio realizado

por (Hong, 2018), se realizó la mutagénesis a partir de secuencias flanqueantes en arroz, sin embargo, esta técnica basada en la transformación por *Agrobacterium* tiene una debilidad a la eficiencia de transformación de los mutágenos (Plant Breeding, 2012). Sin embargo, se logrará comparar poblaciones mutantes independientes indexadas por identificación de etiquetas de secuencias flanqueantes. En la investigación realizada se observa el número de mutaciones en la posición de las secuencias flanqueante, sin embargo, en este estudio no se encontró mayor diferenciación que pueda ser de utilidad. Por consiguiente, se recomiendan el uso de más marcadores moleculares y muestras que prueben la hipótesis de introgresión.

A partir de estas secuencias flanqueantes, se obtuvieron tres árboles genéticos (Figura 14, 15 y 16) de los tres marcadores en estudio. En los árboles genéticos del marcador BM 156, BM 183, BM 160, se puede distinguir los principales grupos de especies del fréjol, incluso llegando a diferenciar grupos a nivel de subsección.

En la Figura 14, el árbol filogenético del marcador BM156; aglomera a todas las muestras en 3 grupos de similitud, identificados con las letras A, B y C. El grupo A es el grupo mayoritario que contiene alelos en su mayoría de mayor peso molecular (exceptuando el alelo 202 del genotipo F64) provenientes de las accesiones andinas. El grupo B, contiene alelos de mediano peso molecular de los materiales "intermedios" (M7S2-206 y M5S3B-222) además del alelo 234 de *P. polyanthus*. El grupo C, incluyen un subgrupo que comprende los alelos mesoamericanos 214 del genotipo 90_J_M, y 220 del genotipo 100_J_M y están relacionados con las accesiones andinas. Se distinguen de este grupo el alelo 204 de *P. acutifolius* (A) y el alelo 206 de *P. coccineus* (A).

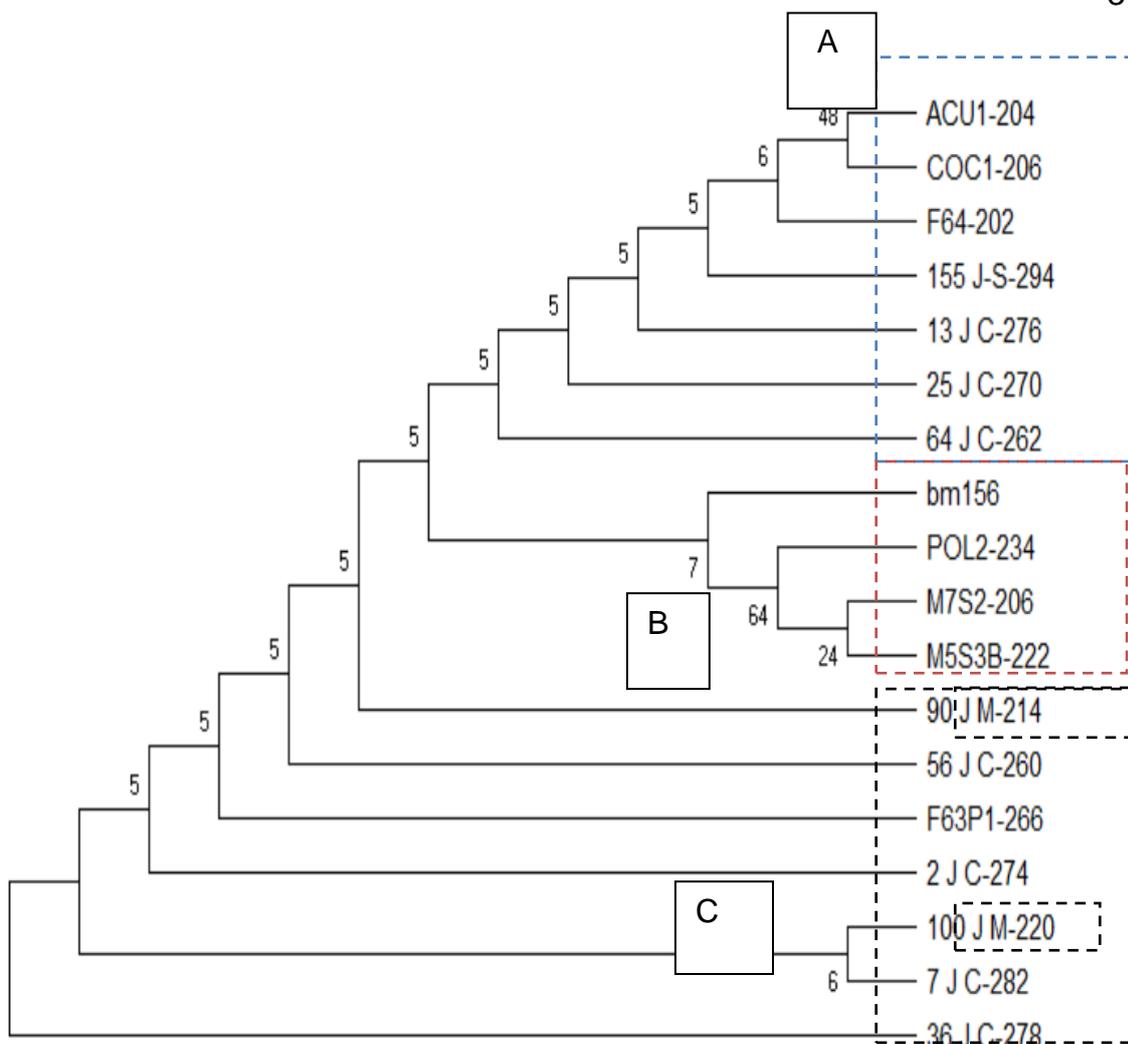


Figura 14. Árbol Filogenético del Marcador BM156

En la Figura 15, se observa el árbol filogenético del marcador BM 160 que aglomera a todas las muestras en 3 grupos de similaridad, identificados con las letras A, B y C. El grupo A es el grupo mayoritario que contiene alelos en su mayoría de mayor peso molecular, exceptuando el alelo mesoamericano 184 del genotipo 93_J_M. El grupo B, está conformado por muestras andinas. El grupo C está conformado por los alelos 184 y 186 candidatos de introgresión de los genotipos mesoamericanos 90_J_M y 99_J_M con las muestras andinas lo que muestra una introgresión del 70-80%, significativamente divergente del grupo. Finalmente, un tercer grupo (C) más divergente lo conforman alelos de *P. acutifolius* y *P. polyanthus*.

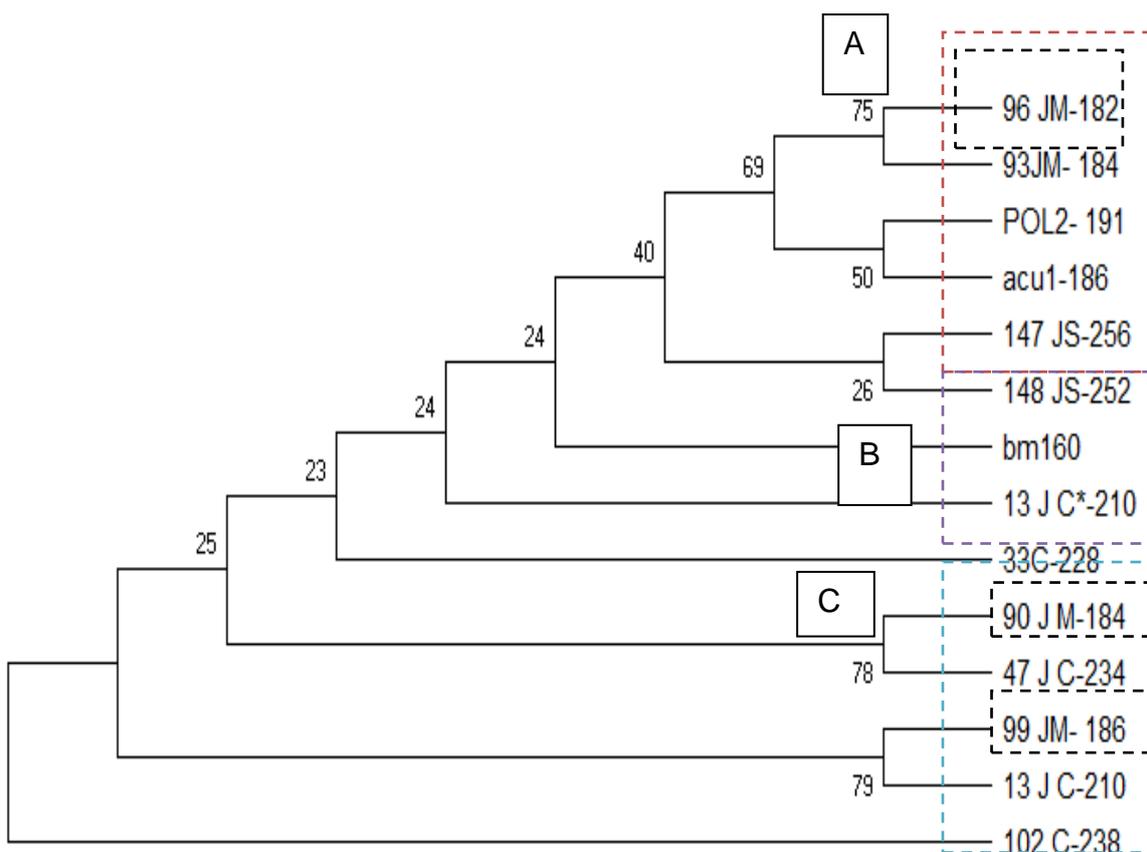


Figura 15. Árbol Filogenético del Marcador BM160

En la Figura 16, se observa el árbol filogenético del marcador BM 183 que aglomera a todas las muestras en cuatro grupos de similitud, identificados con las letras A, B, C y D. El grupo A incluye al alelo 130 de *P. polyanthus*, el cual sorpresivamente se encuentra agrupado con el alelo 130 de un material de fréjol “intermedio” (genotipo M7S2. El grupo B, está conformado por los alelos 130 y 142 de materiales de fréjol “intermedios”. El grupo C lo conforman los alelos mesoamericanos 144 y 158, éste último está cercano al alelo 130 de *P. coccineus*. El grupo D es el grupo mayoritario que contiene alelos andinos en su mayoría de mayor peso (exceptuando el alelo 146 del genotipo F11P5). Finalmente, el alelo 156 de *P. acutifolius* es el más divergente.

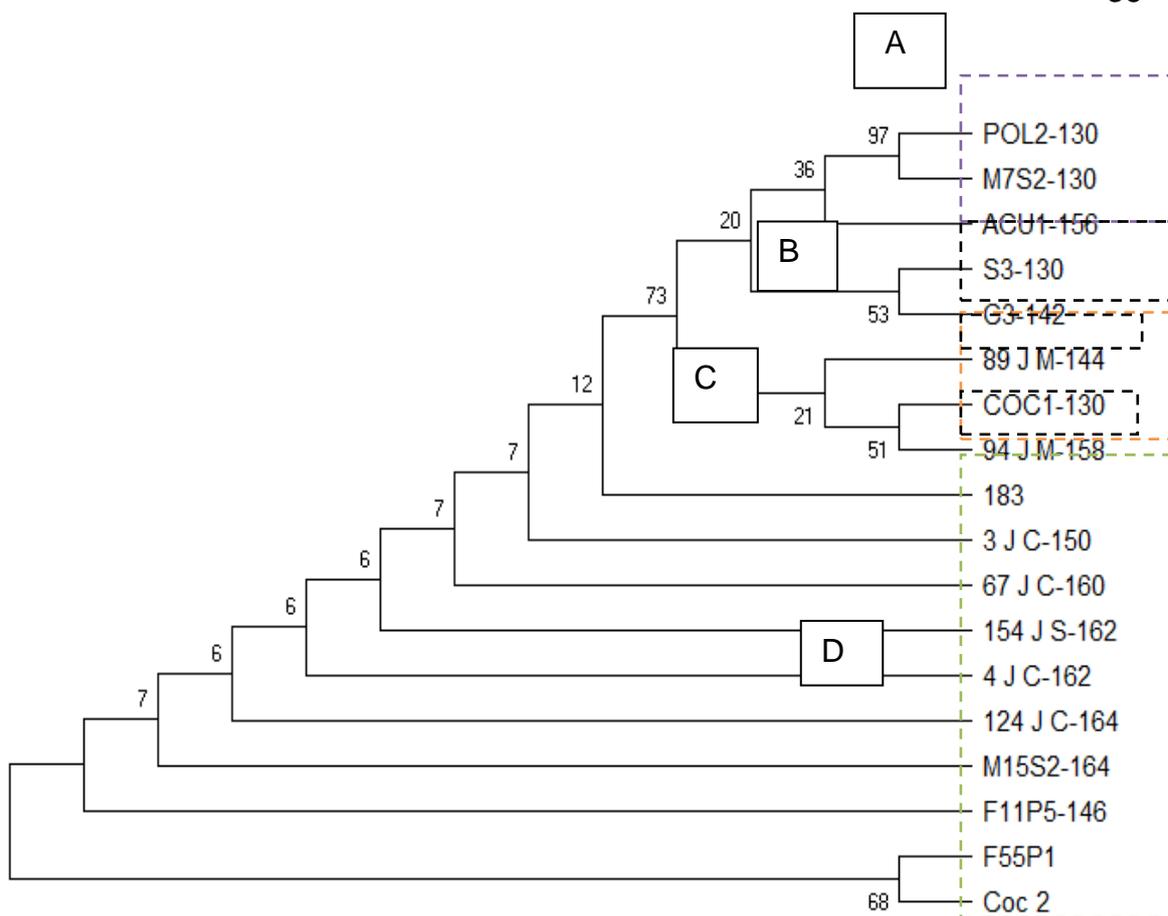


Figura 16. Árbol Filogenético del Marcador BM183

En este estudio se observa que en las filogenias obtenidas de cada uno de los marcadores (BM 160, BM 183, BM 156), la muestra de *Phaseolus acutifolius* en el marcador BM 156 difiere un poco de los demás; a diferencia del marcador BM 160 y BM183 en donde se encuentra en el mismo clúster que el alelo de *Phaseolus polyanthus*. En estudios previos se encontró que *P. vulgaris* está estrechamente relacionado con *P. coccineus* y *P. polyanthus* (Marechal, 1982; Freytag & Debouck, 1996). Cabe recalcar que para la realización de este estudio solo se tuvieron pocas muestras, lo que implica que los resultados obtenidos no son concluyentes.

Hoy en día, se siguen descubriendo fréjoles silvestres, por lo que se requiere del uso de nuevas técnicas y expediciones, para así poder llevar a cabo una reconstrucción precisa de las áreas ancestrales (New Phytologist, 2012). Existen métodos filogeográficos que proporcionan las suficientes herramientas

para acceder con exactitud al origen geográfico y la diversificación de las especies. Con estos estudios se obtendrá mejores resultados y a la vez se reforzarán la singularidad de estas especies con un sistema de investigación en la diversificación, procesos de adaptación en *hotspots* y la domesticación en las regiones de mayor interés de estudio: Mesoamérica y Andina (Cortes, 2013; Genetic Resource Crop Evolution, 2007).

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se validó la gama alélica de seis loci SSR reportados en trabajos previos no publicados, en los que se habían diseñado nuevos oligos, e identificando la presencia de posibles alelos mesoamericanos en materiales de fréjol de Cotacachi y Saraguro (exceptuando el locus BM 183).

Se validó la amplificación de tres loci SSR con nuevos oligos extendidos que permitieron la obtención de un fragmento PCR de alrededor de 1Kb, apropiado para el análisis de polimorfismo (mutaciones) de secuencias colindantes. Asimismo, se validó la amplificación de los oligos extendidos en genotipos “intermedios” de Cotacachi y en ADN de otras especies cultivadas del género *Phaseolus*.

Entre los tres loci SSR analizados, el locus BM 160 es el que mayor nivel de polimorfismo en secuencia colindante presentó y por lo tanto el más informativo entre los marcadores analizados.

Se obtuvo una reconstrucción filogenética para los tres loci SSR analizados debido a que no se logró representar a todos los alelos candidatos de introgresión existentes. De la reconstrucción filogenética de alelos disponibles al momento, se concluye que el locus BM 160 es apropiado para probar la hipótesis de introgresión, ya que permite obtener una clara diferenciación entre alelos mesoamericanos y andinos con aceptables niveles de robustez estadística (valores bootstrap superiores a 70). El alelo 184 del genotipo 13_J_C (único alelo candidato de introgresión representado), se agrupa filogenéticamente con el resto de alelos andinos y por lo tanto este no corrobora la hipótesis de introgresión, sin embargo, estudios futuros podrían dar una conclusión más robusta.

5.2. Recomendaciones

Secuenciar otros alelos candidatos de introgresión en materiales andinos para el locus BM 160 y obtener su posicionamiento en la reconstrucción filogenética. Esto permitirá concluir sobre el origen de estos alelos en materiales andinos de fréjol.

REFERENCIAS

- Baum, D. A. (2005). *The Tree- Thinking Challenge*. *Science*, 310(5750), 979-980. Recuperado el 10 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1126/science.1117727>
- Blair, M.W. (2006). *Microsatellite marker diversity in common bean (Phaseolus vulgaris L.)*. *Theoretical and Applied Genetics*, 113(1), 100-109. Recuperado el 11 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0276-4>
- BMC Plant Biology. (2002). *The molecular genetic linkage map of the model legume Medicago truncatula: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes*. 2(1), 1. Recuperado el 31 de Diciembre de 2018 de <https://doi.org/10.1186/1471-2229-2-1>
- BMC Genomics. (2018). *Comparative genome-wide characterization leading to simple sequence repeat marker development for Nicotiana*. 19(1), 1. Recuperado el 12 de Abril de 2018 de <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4878-4>
- Bragantia. (2008). *Importance de caracteres na dissimilaridade de progenies de batata em geracoes iniciais de selecao*. 67(1), 141-144. Recuperado el 7 de Septiembre de 2018 de <https://doi.org/10.1590/s0006-87052008000100017>
- Burkart, A. (1941). *Sobre la existencia de razas silvestres de Phaseolus vulgaris*. Buenos Aires, Argentina: Springer.
- Ciencias Agrárias. (2006). *Divergencia genética em germoplasma de feijoeiro comum coletado no estado do Paraná, Brasil*. *Semilla*. 27(49), 547. Recuperado el 12 de Octubre de 2018 de <https://doi.org/10.5433/1679-0359v27n4p547>
- Colombo, C., Second, G., Losada Valle, T., & Charrier, A. (1998). *Genetic diversity characterization of cassava cultivars (Manihot esculenta Crantz. I). RAPD markers*. *Genetics and Molecular Biology*, 11(21), 105-113. Recuperado el 15 de Diciembre de 2018 de <https://dx.doi.org/10.1590/s1415-47571998000100018>

- Cortés, A.J. (2013). *On the origin of the common bean (Phaseolus vulgaris L.)*. *American Journal of Plant Sciences*, 4(10), 1998-2000. Recuperado el 1 de Diciembre de 2018 de <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2013.410248>
- Cortés, A.J., & Blair, M.W. (2011). *SNP Marker Diversity in Common Bean (Phaseolus vulgaris L.)*. *Theoretical and Applied Genetics*, 123(5), 827-845. Recuperado el 16 de Julio de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1630-8>
- Crop Science. (2001). *Diversity and origin of Andean landraces of common bean*. 41(3), 854-862. Recuperado el 25 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.413854x>
- Current Science. (2017). *Molecular Diversity and Gene Pool Structure in Common Bean (Phaseolus vulgaris L.)*. 11(7), 20185-20201. Recuperado el 11 de Junio de 2018 de <https://doi.org/10.15520/ctst.v7ill.93>
- Debouck, D., & Hidalgo, R. (1984). *Morfología de la planta del frijol común (Phaseolus vulgaris L.)*. Segunda Edición. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Duke, J.A. (1981). *Handbook of legumes of world economic importance*. First Edition, Plenum Press, New York, p. 344. Recuperado el 2 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8151-8>
- Freytag, F.G., & Debouck, D.G. (1996). *Phaseolus costaricensis, a new wild bean species (Phaseolinae, Leguminosae) from Costa Rica and Panama, Central America*. *Misourri Botanical Garden Press*, 6(3), 157-163. Recuperado el 27 de Diciembre de 2018 de <https://doi.org/10.2307/3391913>
- Figuerola, F., & Avendaño, O. (2008). *Desarrollo de un alimento de humedad de intermedia de fréjol (Phaseolus vulgaris L.)*. Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición, 58(2), 193-200. Recuperado el 18 de Julio de 2018 de <https://www.alanrevista.org/ediciones/2008/2/art-12/>
- Fitotec. (2013). *Origin, Domestication and Diversification of common beans*. *Advances and Perspectives*. 36(2), 95-104. Recuperado el 16 de

Noviembre de 2018 de
[https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=\\$0187-73802013000200002](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=$0187-73802013000200002)

- Gaitán-Solís, E., & Tohme, J. (2002). *Microsatellite Repeats in Common Bean (Phaseolus vulgaris L.): Isolation, Characterization, and Cross-Species Amplification in Phaseolus ssp.* *Crop Science*, 42(6), 2128-2136. Recuperado el 21 de Agosto de 2018 de <https://dx.doi.org/10.2135/cropsci2002.2128>
- Garver, E., & James, K. (2008). Encuesta a Productores para Orientar el Fitomejoramiento del Frijol. *Agronomía Mesoamericana*, 19(1), 07-18. Recuperado el 24 de Septiembre de 2018 de <https://core.ac.uk/display/25647502>
- Genetics and Molecular Research. (2010). *Efficiency of RAPD versus SSR markers for determining genetic diversity among popcorn lines.* 9(1), 9-18. Recuperado el 17 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.4238/vol9-1gmr692>
- Genetics and Molecular Research. (2011). *Genetic diversity in local and commercial dry bean (Phaseolus vulgaris) accessions based on microsatellite markers.* 10(1), 140-149. Recuperado el 1 de Septiembre de 2018 de <https://doi.org/10.4238/vol10-1gmr993>
- Genetics Resour Crop Evolution. (2007). *Comparison of genetic variation among accessions of Aegilops tauschii using AFLP and SSR markers.* 54(2), 237-240. Recuperado el 10 de Mayo de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s10722-006-9143-z>
- Gepts, P., & Debouck, D. (1991). *Origin, Domestication and Evolution of the common bean (Phaseolus vulgaris L.). In Schoonhoven, A. Van., Voysest, O. Common beans: Research for crop improvement.* Primera Edición. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Hong, W.J., & Jung, K.H. (2018). *Comparative Analysis of Flanking Sequence Tags of T-DNA/Transposon Insertional Mutants and Genetics Variations of Fast-neutron Trades Mutants in Rice.* *Journal of Plant Biology*, 61(2),

- 80-84. Recuperado el 16 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s12374-017-0425-0>
- Kaplan, L. (1956). *The cultivated beans of the Prehistoric Southwest*. *Missouri Botanical Garden Press*, 43(2), 189-251. Recuperado el 15 de Mayo de 2018 de <https://doi.org/10.2307/2394674>
- Kaplan, L. (1965). *Archeology and domestication in American Phaseolus (beans)*. *Springer Link*, 19(4), 358-368. Recuperado el 23 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1007/BF02904806>
- Kaplan, L., & Lynch, T.F. (1973). *Early cultivated beans (Phaseolus vulgaris) from an intermontane Peruvian valley*. *Science*, 179(2068), 76-77. Recuperado el 18 de Septiembre de 2018 de <https://doi.org/10.1126/science.179.4068.76>
- Koenig, R.L., & Gepts, P. (1990). *Novel phaseolin types in wild and cultivated common bean (Phaseolus vulgaris Fabaceae)*. *Economic Botany*, 44(1), 50-60. Recuperado el 13 de Diciembre de 2018 de <https://doi.org/10.1007/bf02861066>
- Lagostina, E., & Printzen, C. (2018). *The use of microsatellite markers for species delimitation in Antarctic Usnea SUBGENUS Neuropogon*. *Mycologia*, 110(6), 1-11. Recuperado el 5 de Octubre de 2018 de <https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1512304>
- Matus, I.A., & Hayes, P.M. (2002). *Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats*. *Genome*, 45(6), 1095-1106. Recuperado el 12 de Julio de 2018 de <https://doi.org/10.1139/g02-071>
- Marechal, R. (1982). *Arguments for a global conception of the genus Vigna*. *Taxon*, 31(2), 280-283. Recuperado el 7 de Octubre de 2018 de <https://doi.org/10.2307/1219992>
- Miranda, C.S. (1967). *Origen de Phaseolus vulgaris L. (Frijol común)*. *Agronomía Tropical*, 1(2), 99-109. Recuperado el 3 de Octubre de 2018 de [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=\\$0187-73802013000200003](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=$0187-73802013000200003)

- Mol Breeding. (2014). *Development of mapped simple sequence repeat markers from common bean (Phaseolus vulgaris L.) based on genome sequences of a Chinese landrace and diversity evaluation*. 33(2), 489-496. Recuperado el 14 de Mayo de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9949-2>
- Morgante, M., & Olivieri, A.M. (1993). *PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics*. *The Plant Journal*, 3(1), 175-182. Recuperado el 21 de Diciembre de 2018 de <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1993.t01-9-00999.x>
- Nature Genetics. (2014). *A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications*. 46(1), 707-713. Recuperado el 14 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1038/ng.3008>
- New Phytologist. (2012). *Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (Phaseolus vulgaris) in Mesoamerica and the Andes*. 197(1), 300-313. Recuperado el 31 de Octubre de 2018 de <https://doi.org/10.1111/j.1469.8137.2012.04377.x>
- Plant Biotechnology Journal. (2017). *Genotyping-by-sequencing approaches to characterize crop genomes: choosing the right tool for the right application*. 15(2), 149-161. Recuperado el 11 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1111/pbi.12645>
- Plant Breeding. (2012). *Mapping of quantitative trait loci conferring resistance to brown spot in flue cured tobacco (Nicotiana tabacum L.)*. 131(2), 335-339. Recuperado el 2 de Julio de 2018 de <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2011.01940.x>
- Plos One. (2013). *Evolutionary Dynamics of Microsatellite Distribution in Plants: Insight from the Comparison of Sequence Brassica, Arabidopsis and other Angiosperm Species*. 8(3), e59988. Recuperado el 13 de Septiembre de 2018 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059988>
- Plos one. (2019). *Evolution of SSR diversity from wild types to U.S. advanced cultivars in the Andean and Mesoamerican domestications of common bean (Phaseolus vulgaris)*. 14(1), 252-254. Recuperado el 11 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211342>

- Saitou, N., & Nei, M. (1987). *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. *Molecular Biology and Evolution*, 4(1), 406-425. Recuperado el 9 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Singh, S.P., & Gutiérrez, J. A. (1984). *Geographical distribution of the DL1 and DL2 genes, and causing hybrid dwarfism in Phaseolus vulgaris L., their association with seed size, and their significance to breeding*. *Euphytica*. 33(2), 337-345. Recuperado el 10 de Mayo de 2018 de <https://doi.org/10.1007/BF00021130>
- Tamura, K. (2013). *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0*. *Molecular Biology and Evolution*, 30(1), 2725–2729. Recuperado el 13 de Octubre de 2018 de <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- The Plant Journal. (2018). *Crop SNP db: a database of SNP array data for Brassica crops and hexaploid bread wheat*. 1(4). Recuperado el 14 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1111/tpj.14194>
- Theoretical and Applied Genetics. (2003). *Development of a genome-wide anchored microsatellite map for a common bean (Phaseolus vulgaris L.)*. 107(8), 1362-1374. Recuperado el 1 de Septiembre de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1398-6>
- Theoretical and Applied Genetics. (2002). *Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat*. 104(2-3), 399-407. Recuperado el 2 de Diciembre de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s001220100738>
- Theoretical and Applied Genetics. (2004). *Using molecular markers to assess the effect of introgression on quantitative attributes of common bean in the Andean gene pool*. 108(2), 243-252. Recuperado el 8 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1437-3>
- Theoretical and Applied Genetics. (2010). *Genetic diversity, inter-gene pool introgression and nutritional quality of common beans (Phaseolus vulgaris L.) from Central Africa*. 121(2), 237-248. Recuperado el 22 de Octubre de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1305-x>

- Theoretical and Applied Genetics. (2010). *Cloning and genetic diversity analysis of a new P5C5 gene from common bean (Phaseolus vulgaris L.)*. 120(7), 1393-1404. Recuperado el 2 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1263-3>
- Thomson, M. J. (2014). *High-Throughput SNP Genotyping to Accelerate Crop Improvement*. *Plant Breeding and Biotechnology*, 2(3), 195-212. Recuperado el 7 de Junio de 2018 de <https://doi.org/10.9787/pbb2014.2.3.195>
- Trends in Plant Science. (1996). *Polymorphism revealed by simple sequence repeats*. 1(7), 215-222. Recuperado el 17 de Diciembre de 2018 de [https://doi.org/10.1016/1360-1385\(96\)86898-1](https://doi.org/10.1016/1360-1385(96)86898-1)
- Trends in Plant Science. (2011). *Crop genome sequencing: lessons and rationales*. 16(2), 77-88. Recuperado el 5 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.10.005>
- Varshney, R.K., & McCouch, S.R. (2014). *Harvesting the Promising Fruits of Genomics: Applying Genome Sequencing Technologies to Crop Breeding*. *Plos Biology*, 12(6), e1001883. Recuperado el 11 de Octubre de 2018 de <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001883>
- Voysesst Voysesst, O. 2000. *Mejoramiento Genético del Frijol (Phaseolus vulgaris L.)*. Primera Edición. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Wang, Q., & Wang, S. (2015). *Genome-wide mining, characterization and development of microsatellite markers in Gossypium species*. *Sci-Rep*, 5(1), 10638. Recuperado el 7 de Septiembre de 2018 de <https://doi.org/10.1038/srep10638>
- Wang, X., & Wang, L. (2016). *GMATA: An Integrated Software Package for Genome-Scale SSR Mining, Marker Development and Viewing*. *Frontiers in Plant Science*, 7(1). Recuperado el 8 de Diciembre de 2018 de <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01350>

ANEXOS

Anexo A

Lista de accesiones de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L). y (*Phaseolus coccineus* L) de Cotacachi y Saraguro más muestras de Jácome (2017) y Torres (2012) utilizadas para esta investigación.

Cuadro 1. Genotipos de mezcla de fréjol de Cotacachi y Saraguro obtenidos de comunidades en el ciclo de cultivo 2018	
IDENTIFICACIÓN DEL LABORATORIO	NOMBRE DEL AGRICULTOR
M1S1	Mercedes Montaña
M1S2	
M1S3	
M1S4	
M2S1	Rosario Japón
M2S2	
M2S3	
M3S1	Zoila Morocho
M3S2	
M3S3	
M4S1	Luis Huillas
M4S2	
M4S3	
M4S4	

M5S1	BoudilloHuallas
M5S2	
M5S3	
M5S4	
M6S1	Isabel Contento
M6S2	
M7S1	Maria Teresa Nancela
M7S2	
M7S3	
M7S4	Maria Teresa Nancela
M8S1	Manuel Cabrera
M8S2	
M8S3	
M8S4	
M9S1	Luis García
M9S2	
M9S3	
M9S4	
M10S1	Manuel Guamán
M10S2	
M10S3	
M10S4	

M11S1	Aquilino Nancela
M11S2	
M11S3	
M11S4	
M12S1	Sara Pacheco
M12S2	
M12S3	
M12S4	
M13S1	Luis Huillas
M13S2	
M13S3	
M13S4	
M14S1	Religio Suquilanda
M14S2	
M14S3	
M14S4	
M15S1	Virginia Saca
M15S2	
M15S3	
M15S4	
M16S1	María Angélica Guamán
M16S2	

M16S3	
M17S1	Feliciano Armijos
M17S2	Feliciano Armijos
M17S3	
M17S4	
M18S1	
M18S2	Angel Nancela
M18S3	
M18S4	
S1	
S2	C2
S3	C3
S4	C4
S6	C5
S8	C6
S9	C7
S10	C8
S11	C9
S12	C10
S131	C11
S132	C12
S141	C13

S142	C14
C16	C15
C17	C18
C19	C20
C21	Acu1
POL2	COC1
COC2	VAX2

Cuadro 2. Genotipos componentes de variedades mezcla de fréjol de Cotacachi obtenidos de comunidades en el ciclo de cultivo 2015

IDENTIDAD LABORATORIO	DEL	TIPO DE VARIEDAD
2_J_C		Chakra
4_J_C		Chakra
5_J_C		Chakra
6_J_C		Chakra
7_J_C		Chakra
9_J_C		Chakra
13_J_C		Chakra
25_J_C		Allpa
28_J_C		Allpa
31_J_C		Allpa
34_J_C		Allpa

36_J_C	Allpa
47_J_C	Allpa
56_J_C	Allpa
64_J_C	Allpa
67_J_C	Canario
69_J_C	Canario
102_J_C	Chakra
124_J_C	Chakra
125_J_C	Chakra
F111	Andino
F112	Andino
F11P5	Andino
F29P5	Andino
F2P2	Andino
F3P2	Andino
F4P2	Andino
F63P1	Andino
F64	Andino

Cuadro 3. Genotipos componentes de variedades mezcla de fréjol de Saraguro obtenidos de comunidades en el ciclo de cultivo 2015

IDENTIDAD DEL LABORATORIO	TIPO DE VARIEDAD
79_J_S	Canario
145_J_S	Chakra
147_J_S	Chakra
148_J_S	Chakra
149_J_S	Chakra
153_J_S	Chakra
154_J_S	Chakra
157_J_S	Chakra
161_J_S	Chakra
167_J_S	Chakra
155_J_S	Chakra
F14P3b	Andino
F55P1	Andino

Cuadro 4. Genotipos diferenciales Mesoamericanos

IDENTIDAD DEL LABORATORIO	TIPO DE VARIEDAD
89_J_M	Mesoamericanos
90_J_M	Mesoamericanos
91_J_M	Mesoamericanos
92_J_M	Mesoamericanos
93_J_M	Mesoamericanos
94_J_M	Mesoamericanos
96_J_M	Mesoamericanos
97_J_M	Mesoamericanos
98_J_M	Mesoamericanos
99_J_M	Mesoamericanos
100_J_M	Mesoamericanos

Anexo B.

Fotografías de fenotipos de semillas de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) y (*Phaseolus coccineus*) seleccionadas y clasificadas para el estudio.

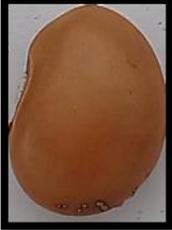
			
M1S1	M1S2	M2S1	M2S2
			
M12S3	M3S1	M3S2	M3S3
			
M4S1	M4S2	M4S3	M4S4
			

M5S1	M5S2	M5S3	M5S4
			
M6S1	M6S2	M7S1	M7S2
			
M7S3	M7S4	M8S1	M8S2
			
M8S3	M8S4	M9S1	M9S2
			
M9S3	M9S4	M10S1	M10S2

			
M10S3	M10S4	M11S1	M11S2
			
M11S3	M11S4	M12S1	M12S2
			
M12S3	M12S4	M13S1	M13S2
			
M13S3	M13S4	M14S1	M14S2

			
M14S3	M14S4	M15S1	M15S2
			
M15S3	M15S4	M16S1	M16S2
			
M16S3	M17S1	M17S2	M17S3
			
M17S4	M18S1	M18S2	M18S3

			
M18S4	S1	S2	S3
			
S4	S6	S8	S9
			
S10	S11	S12	S131
			
S132	S141	S142	C1

			
C2	C3	C4	C6
			
C7	C8	C9	C10
			
C11	C12	C13	C14
			
C15	C16	C17	C18

			
C19	C20	C21	

Anexo C

Coctel de amplificación y el programa en el termociclador para la validación de las muestras de ADN con el cebador BM 154.

VALIDACIÓN DE ADN					
	CI	CF	VOL, 1rx (uL)	MARCADOR	Tm
				BM 154	50°C
Agua			2,18		
BUFFER PCR (X)	5	1	1,5		
MgCl2 (mM)	25	2	0,6	Tem T°	Tiempo (min)
dNTPs (mM)	5	0,25	0,38	94	5
Primer (uM) F	10	0,5	0,38	94	45 s
Primer (uM) R	10	0,5	0,38	50	1
Taq (U/uL)	5	0,07	0,1	72	2
MUESTRA (ng/uL)	5	1,33	2	72	7
VOL TOTAL (uL)			7,5	10	10

Anexo D

Coctel de amplificación y el programa usado en el termociclador empleado para el proceso de validación con los marcadores de introgresión.

MARCADOR (BM 160-BM 183- BM 156)							
MIX PCR	CI	CF	VOL.1 rx				
AGUA UP			4,6				
BUFFER PCR white (x)	5	1	5				
MgCl2 (mM)	25	1,2	1,2	BM 160/BM183/ BM156			
dNTP's	5	0,2	1		Temperatura	Tiempo	Ciclos
Primer (uM)	2	0,32	4	1	94°C	5 MIN	1 ciclo
Primer (uM)	2	0,32	4	2	94°C	1 MIN	40 ciclos
Taq (U/uL)	5	0,04	0,2	3	57°C, 53°C, 55°C	1,3 MIN	
Muestra (ng/uL)	5	1	5	4	72°C	2,3 MIN	
Volumen de reacción			25	5	72°C	10 MIN	1 ciclo
ng DE ADN POR RX	(ng)		25	6	4°C	10 MIN	1 ciclo

Anexo E

Reactivos y cantidades utilizadas para la clonación

Reactivos	Cantidad (uL)
2x Rapid Ligation Buffer, t4 dna Ligase	5uL
pGEM [®] .T Easy Vector (50ng)	1uL
PCR Product	2uL
T4 DNA Ligase	1uL
Water ultra-pure	1 uL
Total	10uL

Anexo F

Coctel de amplificación de las bacterias que presentan el fragmento de interés

VALIDACIÓN DE CLONACIÓN								
MIX PCR	CI	CF	VOL.1	VOL.? RX (uL)				
				50				
AGUA UP			2.9	145				
BUFFER PCR BLANCA (x)	10	1	0.625	31.25				
MgCl2 (mM)	50	2	0.25	12.5				
dNTP's	10	0.2	0.125	6.25		Temperatura	Tiempo	Ciclos
Primer (uM)	10	0.2	0.125	6.25	1	94°C	5 MIN	1 ciclo
Primer (uM)	10	0.2	0.125	6.25	2	94°C	30s	30 ciclos
Taq (U/uL)	5	0.08	0.1	5	3	46°C	20s	
Muestra (ng/uL)	10	1.6	2	DISPENSAR=	4	70°C	1 MIN	
Volumen de reacción			212.5	5.25	5	70°C	10 MIN	1 ciclo
Volumen Total			6.25	uL por muestra	6	4°C	5 MIN	1 ciclo

Anexo G.

Matriz alélica de accesiones de Saraguro, Cotacachi, Mesoamericanos y fenotipos seleccionados por marcador.

BM 183				
Muestras	GENOTIPAJE PL		GENOTIPAJE Trabajo Previo 2	
124_J_C	164	164	164	164
154_J_S	148	148	148	148
161_J_S	162	162	162	162
3_J_C	150	150	158	158
4_J_C	162	162	162	162
67_J_C	160	160	160	160
89_J_M	144	144	144	144
91_J_M	146	146	146	146
92_J_M	144	144	144	144
94_J_M	158	158	158	158
97_J_M	144	144	144	144
F11P5	150	150	146	146
c20	116	116		
C13	130	130		
C16	130	130		
C20	130	130		
Coc 1	130	130		
M7S2	130	130		
Pol 2	130	130		
S3	130	130		
C3	142	142		
Lun 16	144	144		
Lun 4	144	144		
M10S1	150	150		
M11S2	150	150		
Acu 1	156	156		
M15S2	164	164		
M18S3	168	168		

BM 156				
Muestras	GENOTIPAJE PL.		GENOTIPAJE Trabajo Previo 2	
	100_J_M	220	220	220
13_J_C	276	276	276	276
149_J_S	268	268	268	268
155_J_S	300	300	294	294
15_J_C	274	274	274	274
161_J_S	272	272	272	272
25_J_C	268	268	270	270
28_J_C	272	272	268	268
2_J_C	272	272	274	284
31_J_C	278	278	278	278
34_J_C	272	272	272	272
36_J_C	278	278	278	278
56_J_C	260	260	260	260
5_J_C	282	282	282	282
64_J_C	262	262	262	262
69_J_C	274	274	274	274
7_J_C	282	282	282	282
90_J_M	214	214	214	214
91_J_M	220	220	220	220
92_J_M	220	220	220	220
94_J_M	220	220	220	220
97_J_M	214	214	212	212
9_J_C	292	292	292	292
F111	284	284	224	224
F112	284	284	224	224
F29P5	300	300	214	294
F2P2	282	282	186	188
F3P2	280	280	184	184
F4P2	280	284	178	180
F63P1	266	266	266	266
F64	296	296	202	202
VAX 2	226	226	226	226
ACU1	204	204		
C20	206	206		
C3	206	222		
COC1	206	206		
M7S2	206	206		
S3	206	222		
Lun 16	212	212		
Lun 4	212	212		
M5S3B	222	222		
S1	222	222		
C16	232	232		
Pol2	234	234		

BM 160				
Muestras	GENOTIPOS PL		GENOTIPO JJ	
	102_J_C	238	238	238
125_J_C	212	242	212	244
127_J_C	184	216	186	216
13_J_C	184	210	186	210
145_J_S	184	236	186	236
147_J_S	256	256	256	256
149_J_S	252	252	252	252
153_J_S	228	228	228	256
157_J_S	184	250	186	250
164_J_S	184	240	184	240
167_J_S	184	248	186	248
16_J_C	260	260	260	260
172_J_S	184	236	184	236
33_J_C	228	228	224	226
34_J_C	216	216	214	216
47_J_C	234	246	234	246
6_J_C	234	234	232	234
79_J_S	230	230	230	230
90_J_M	184	184	186	186
93_J_M	184	184	184	184
96_J_M	182	182	182	182
99_J_M	186	186	188	188
Acu 1	186	186		
Pol 2	191	191		

