



Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias

**FECHA DE PRESENTACIÓN:** 2009-02

**ESTACIÓN EXPERIMENTAL:** Santa Catalina

**DEPARTAMENTO:** Biotecnología

**COLABORADORES:** Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos (PRONALEG)  
Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos (DENAREF)

**PROYECTO:** Leguminosas Fortalecimiento-1521

**RESULTADO:** Caracterización de germoplasma

**ACTIVIDAD:** **Caracterización molecular de la colección lojana de fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L) del INIAP**

**UBICACIÓN:** Estación Experimental Santa Catalina

**AUTOR:** Egda. Verónica Bonilla

**COAUTORES:** Dr. Eduardo Morillo  
Ing. Eduardo Peralta MSc.

**FECHA DE INICIO:** 2009-3

**FECHA DE TERMINACIÓN:** 2009-12

**PRESUPUESTO:** \$ 4703,39

**FUENTE DE FINANCIAMIENTO:** INIAP (85%)  
Tesisista (15%)

El presente estudio comprende el análisis molecular de 123 accesiones, colectadas en la provincia de Loja, considerada como uno de los principales centros de diversificación de ésta leguminosa (Debouck, 1992 citado por González, 2002) mediante el uso de microsatélites reportados para *Phaseolus vulgaris* L. En la colección nacional del banco de germoplasma del INIAP, de las 190 accesiones de fréjol arbustivo colectadas en el Ecuador 123 son lojanas, es decir 65% de las accesiones ecuatorianas, un porcentaje que hace de ésta provincia una región de interés para el análisis de la diversidad de fréjol arbustivo local.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Dada la importancia agronómica del fréjol en la región y a nivel mundial, la caracterización de germoplasma es una actividad prioritaria para los programas de mejoramiento y los Bancos de germoplasma. El análisis de diversidad genética a nivel molecular, complementado con información agronómica y morfológica aportará a un mejor manejo y potenciación de los recursos genéticos de fréjol arbustivo, principalmente de origen local y de uso tradicional. La caracterización molecular permitirá conocer la variabilidad genética de la colección, establecer semejanzas y diferencias entre las accesiones y distinguir genotipos estrechamente relacionados, información de importancia en los procesos de premejoramiento con fines de uso de la diversidad local. Además la información de la diversidad genética en esta provincia permitirá comparar con la riqueza genética de otras regiones del país con perspectivas de establecer estrategias de conservación in-situ de este grano.

El presente estudio forma parte de la Caracterización Molecular de la colección nacional de fréjol arbustivo de la colección del Banco Nacional de Germoplasma, actividad enmarcada dentro del proyecto de Fortalecimiento-Seguridad Alimentaria, rubro leguminosas.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 GENERAL

Caracterizar la diversidad genética de la colección lojana de fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) con marcadores microsatélites en proceso automatizado de genotipificación.

### 3.2 ESPECÍFICOS

- Estandarizar las condiciones de genotipificación automatizada de SSR para *P. vulgaris* en el secuenciador ABI-310.
- Registrar la diversidad alélica de 123 accesiones de fréjol arbustivo lojanas con 8 marcadores microsatélites (SSR).
- Estimar el nivel de heterocigosidad y polimorfismo de la colección lojana de fréjol arbustivo.
- Determinar duplicados y grupos representativos de la diversidad en la colección lojana de fréjol.
- Identificar zonas de mayor diversidad genética de *P. vulgaris* en la provincia de Loja.

periodo es posible distinguir la mezcla de semilla en cada accesión. Posteriormente se extraerá el ADN utilizando un kit comercial.

**Extracción y Cuantificación de ADN:** Se extraerá ADN genómico de una planta de cada accesión utilizando el kit comercial de extracción “Purelink 96 Genomic DNA Kit (INVITROGEN Ref. No. K1821-04)”. El ADN se cuantificará en geles de agarosa 1% con tampón TAE 1X comparándolo con un DNA de referencia (ADN Low Mass Ladder). Posteriormente las soluciones de ADN se homogenizarán a una concentración de 5 ng/μl con agua de tartrazine para los ensayos de amplificación de SSRs.

**Amplificación de SSR:** Se emplearán 8 primers microsátelites seleccionados a partir de un screening de diversidad de 16 SSRs reportados por Gaitán *et al.* (2002) y 9 utilizados por el CIAT (M.Blair, com. Pers). Los primers que se probarán se detallan en el anexo 3. Se estandarizarán las condiciones de amplificación en multiplex con primers fluoromarcados para su análisis en el secuenciador ABI310.

**Genotipaje de SSRs:** El proceso de caracterización de la colección de fréjol arbustivo comprende dos fases metodológicas. La primera incluye la estandarización en múltiplex de los primers seleccionados en la fase de screening, y una segunda comprende el genotipaje en serie de la colección lojana de *P. vulgaris*. Ambos procesos se realizarán en un secuenciador ABI-310, el cual funciona de forma automática inyectando las muestras en un capilar previamente cargado con un polímero que funciona como la matriz de acrilamida:bisacrilamida:úrea, permitiendo resolver fragmentos de ADN de cadena sencilla que se diferencian en una única base. A una altura determinada el láser detecta la fluorescencia emitida por cada cadena sencilla de ADN fluorescente y traduce esta emisión de fluorescencia en la secuencia correspondiente. Una vez desarrollada la electroforesis de la primera muestra, el capilar se vacía rellenándose nuevamente con polímero fresco. Se inyecta a continuación una segunda muestra, se procede a desarrollar nuevamente la electroforesis y así sucesivamente (Rodríguez, 2008). El marcaje de primers hasta con cuatro tipos de fluorocromos permite el multiplexaje de hasta cuatro SSR en una misma corrida electroforética sin tomar en cuenta el tamaño de los fragmentos de amplificación, y acelerando significativamente el proceso de genotipaje.

### 6.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La matriz de datos obtenida del software de registro de datos será importada a EXCEL para su importación a varios paquetes estadísticos: Genetix (Belkhir *et al.* 2006), PowerMarker V3.0 (Liu y Muse, 2005), FSTAT (Goudet, 2001) y NTSYS (RonE, 2002). Entre los parámetros de diversidad a determinarse mencionemos: porcentaje de loci polimórficos, riqueza alélica, número efectivo de alelos, heterocigosis observada y esperada al equilibrio de Hardy-Weinberg, parámetros  $F$  (índice de fijación  $F_{st}$  de diferenciación genética entre poblaciones) y diferenciación genética ( $D_{st}$ ). Adicionalmente se realizarán como análisis de agrupamiento o *Cluster analysis* y análisis multivariados (PCO y AFC) e identificación de duplicados mediante comparación de genotipos multilocus SSR.

El análisis estadístico de los datos comprende:

$H_s$ : es la heterocigosis esperada en la subpoblación bajo la hipótesis de Hardy-Weinberg.

$H_o$ : es la heterocigosis observada en la población total.

El  $F_t$  mide la desviación global al equilibrio de Hardy-Weinberg, y  $F_s$  mide la desviación al equilibrio de Hardy-Weinberg en las subpoblaciones. Un  $F_s$  positivo traduce un exceso de homocigotos y un valor negativo un déficit en homocigotos. Para nuestro análisis, el  $F_s$  y su significancia (test) serán calculadas con el programa GENPOPOP 3.4 (Raymond y Rousset, 1995).

El  $F_{st}$  mide la desviación a Hardy-Weinberg debido a la diferenciación entre subpoblaciones. Ese parámetro es comúnmente utilizado para determinar si existe flujo de genes entre poblaciones. En efecto, mientras el valor del  $F_{st}$  es más elevado, menos intercambio genético hay entre las poblaciones.

Slatkin (1995) propone un equivalente del  $F_{st}$  adaptado a las particularidades de los microsatélites, el  $R_{st}$ . Mientras que el  $F_{st}$  se basa en las diferencias de frecuencias alélicas, el  $R_{st}$  se basa en las diferencias de tallas alélicas:

$$R_{st} = \frac{S - S_w}{S}$$

Donde  $S$  es la media de diferencias al cuadrado de las tallas alélicas entre pares de alelos, y  $S_w$  la media de la suma de las diferencias al cuadrado de las tallas alélicas entre cada subpoblación.

El cálculo del  $R_{st}$  se basa en la hipótesis que los microsatélites mutan según el modelo SMM (*Stepwise Mutation Model*). Bajo este modelo, cada evento de mutación crea un nuevo alelo por adición o delección de una sola unidad de repetición. En este caso, la distancia entre dos alelos está directamente correlacionada con la talla de estos alelos: más los alelos difieren en talla, mayor distancia entre ellos.

En este análisis se calcularán ambos parámetros ( $F_{st}$  y  $R_{st}$ ). Los  $F_s$  entre cada población serán estimados según el método de Weir y Cokerhar (1984) y su significancia será testada con un test G con el programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001).

#### b) Análisis de estructura genética

Para explorar la diversidad genética se utilizarán dos tipos de análisis: 1) la representación en árbol (análisis de agrupamiento) y, 2) en Coordenadas Principales (PCO).

**Análisis de Agrupamiento:** La representación en árbol busca representar las relaciones individuales, se basan en una matriz de distancias genéticas individuales. Con el programa PowerMarker este análisis incluye los siguientes pasos:

**1) Cálculo de frecuencia:** El set de datos serán convertidos a datos de frecuencia (1 y 0) a través de esta opción en PowerMarker. La matriz resultante será incorporada al programa NTSYS para un análisis de Coordenadas Principales (PCO).

## 7. PRESUPUESTO:

A continuación se presenta un cuadro presupuestado por cada etapa de trabajo.

### ETAPA I. Caracterización Molecular

| ACTIVIDAD                                      | Unidad      | Cantidad | \$/Unit USD | \$/Total USD    |
|--|-------------|----------|-------------|-----------------|
| Extracción de ADN (kit comercial)              | Kits (1x4)  | 2        | 1125        | 2250            |
| Cuantificación de ADN (en gel)                 | 20 ADNs     | 7        | 2,06        | 14,42           |
| PCR para 1230 reacciones<br>(123 ADN x 10 SSR) | 1 ADN/1 SSR | 1230     | 1,5         | 1845            |
| <b>TOTAL</b>                                   |             |          |             | <b>4109,42*</b> |

\* Valores calculados según los costos de uso del secuenciador LI-COR y el método de marcaje M13-tailing. Estos costos son referenciales ya que los costos para el secuenciador ABI-310 no están a la fecha disponibles.

### ETAPA II. Costos de Elaboración del documento final

| ACTIVIDAD                     | Unidad | Cantidad | \$/Unit USD | \$/Total USD     |
|-------------------------------|--------|----------|-------------|------------------|
| Fotocopias, impresión y otros | 1 hoja | 500      | 0,5         | \$ 250,00        |
| Empastados.                   | und    | 6        | 20          | \$ 120,00        |
| <b>TOTAL</b>                  |        |          |             | <b>\$ 370,00</b> |

### Personal

| ACTIVIDAD    | Unidad  | Cantidad | \$/Unit USD | \$/Total USD     |
|--------------|---------|----------|-------------|------------------|
| Tesista      | Tesista | 10 meses | 280,50      | 2805,00          |
| <b>TOTAL</b> |         |          |             | <b>\$2805,00</b> |

| ETAPA                                      | COSTO (USD)       |
|--|-------------------|
| I. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR               | \$ 4109,42        |
| II. COSTOS ELABORACIÓN DEL DOCUMENTO FINAL | \$ 370,00         |
| <b>SUBTOTAL</b>                            | <b>\$ 4479,42</b> |
| IMPREVISTOS (5%)                           | \$ 223,97         |
| <b>COSTO TOTAL</b>                         | <b>\$ 4703,39</b> |

| FUENTE DE FINANCIAMIENTO | % Aporte   |
|--------------------------|------------|
| INIAP                    | 85         |
| Tesista                  | 15         |
| <b>TOTAL</b>             | <b>100</b> |

- MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA ACUACULTURA Y PESCA DEL ECUADOR (MAG). (2002).** El Fréjol. Disponible en: [http://www.sica.gov.ec/cadenas/frejol/docs/frej\\_esp.htm](http://www.sica.gov.ec/cadenas/frejol/docs/frej_esp.htm)
- Murillo, A., Pinzón, J., Peralta, E. (1998).** Catálogo del Banco de Germoplasma de fréjol, arveja, haba y lenteja. INIAP-EESC, PRONALEG, PROFIZA-COSUDE, PRSP-U. de Minnesota, PREDUZA-Holanda.
- Nei, M. (1987).** Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, New York, USA.
- Raymond, M., & Rousset, F. (1995).** An exact test for population differentiation. *Evolution*, **49**, 1280-1283.
- Rodríguez. (2008).** Secuenciación automática de ADN. Servicio de Secuenciación automática de ADN. Instituto de Investigaciones Biomédicas (IB - CSIC). Extraído de Internet el 5 de octubre del 2008 desde <http://www.iib.uam.es/servicios/seq/otros/SecuenciaADN/biomed1.htm#capitulos>
- Rohlf, J. (2002).** Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Department of Ecology and Evolution State University of New York. New York-United States of America.
- Slatkin, M. (1995).** A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**, 457-462
- Weir, B.S. (1996).** Genetic data analysis II, Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
- Wright, S. (1951).** The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.*, **15**, 323-354.
- Yu, K., Park S., Poysa V. (1999).** Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). Genome Vol.42. NRC Canada

**ANEXO 2.** Lista de las 123 accesiones lojanas de fréjol arbustivo de la colección del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP.

| Nombre local     | Cantón    | Nro de accesiones |
|------------------|-----------|-------------------|
| Amarillo         | Loja      | 1                 |
|                  | Espíndola | 1                 |
|                  | Calvas    | 1                 |
| Amarillo 23-1    | Loja      | 1                 |
| Amarillo 23-2    | Loja      | 1                 |
| Amarillo anchado | Loja      | 1                 |
| Amarillo claro   | Espíndola | 1                 |
| Amarillo oscuro  | Espíndola | 1                 |
| Amarillo tacho   | Loja      | 7                 |
|                  | Espíndola | 1                 |
| Bayo alargado    | Catamayo  | 1                 |
| Bayo oscuro      | Loja      | 1                 |
| Bayo pintado-2   | Loja      | 1                 |
| Blanco           | Loja      | 4                 |
|                  | Catamayo  | 1                 |
| Blanco bolón     | Loja      | 3                 |
| Blanco pequeño   | Loja      | 2                 |
| Blanco tacho     | Loja      | 1                 |
| Bola 19-1        | Loja      | 1                 |
| Bola ent. 29-2   | Loja      | 1                 |
| Bola rosada-24   | Loja      | 1                 |
| Bola-60          | Loja      | 1                 |
| Café claro       | Loja      | 1                 |
| Café jaspeado    | Loja      | 1                 |
| Canario alargado | Loja      | 1                 |
| Chabelo 20       | Loja      | 2                 |
| Crañado redondo  | Loja      | 1                 |
| Colorado 30-1    | Loja      | 1                 |
| Colorado 30-2    | Loja      | 1                 |
| Crema jaspeado   | Loja      | 1                 |
| Crema jaspiado   | Loja      | 2                 |
| Crema manchado   | Loja      | 7                 |
| Crema moteado    | Espíndola | 1                 |
| Crema tacho      | Loja      | 3                 |
| E-1028           | Loja      | 1                 |
| E-1039           | Loja      | 1                 |
| E-1053           | Loja      | 1                 |
| E-1058-1         | Loja      | 1                 |
| E-1059           | Loja      | 1                 |
| E-1060           | Loja      | 1                 |
| E-1073           | Loja      | 1                 |
| E-1089           | Loja      | 1                 |
| E-1209           | Loja      | 1                 |

|                   |           |            |
|-------------------|-----------|------------|
| E-1376            | Loja      | 1          |
| Entreverado -38-1 | Loja      | 2          |
| Entreverado -38-2 | Loja      | 1          |
| Julián 1-1        | Loja      | 1          |
| Mantequilla       | Calvas    | 1          |
| Mantequilla 16-1  | Loja      | 1          |
| Mantequilla 28-1  | Loja      | 1          |
| Mantequilla 35-2  | Loja      | 1          |
| Mataleño 45-1     | Loja      | 1          |
| Morado anchado    | Loja      | 1          |
| Morado pintado    | Loja      | 1          |
| Negro tacho       | Loja      | 1          |
| Percal 11-4       | Loja      | 1          |
| Percal 34         | Loja      | 1          |
| Percal blanco     | Loja      | 1          |
| Perú 14-1         | Loja      | 1          |
| Perú 14-2         | Loja      | 1          |
| Peruano 32        | Loja      | 1          |
| Pintado 2         | Loja      | 1          |
| Rojo alargado     | Loja      | 1          |
|                   | Espíndola | 2          |
| Rojo bolón        | Loja      | 1          |
|                   | Espíndola | 1          |
| Rojo las. tacho   | Loja      | 1          |
| Rojo jaspeado     | Loja      | 1          |
|                   | Espíndola | 4          |
| Rojo jaspiado     | Loja      | 1          |
| Rojo manchado     | Loja      | 1          |
|                   | Espíndola | 4          |
| Rojo moteado      | Espíndola | 1          |
| Rojo oscuro       | Espíndola | 1          |
| Rojo racho        | Calvas    | 1          |
| Rojo tacho        | Espíndola | 2          |
|                   | Calvas    | 1          |
| Rosado bolón      | Loja      | 1          |
| Rosado jaspeado   | Loja      | 1          |
| Rosado jaspiado   | Loja      | 1          |
| Rosado manchado   | Loja      | 1          |
| Rosado pintado    | Loja      | 1          |
| Rosado tacho      | Espíndola | 1          |
| Seda 6-3          | Loja      | 1          |
| SN-JF-29-2        | Loja      | 1          |
| Urico             | Loja      | 1          |
|                   | Espíndola | 1          |
| <b>TOTAL</b>      |           | <b>123</b> |