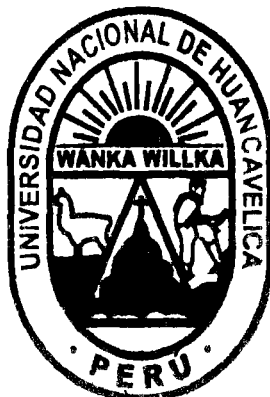


# UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCAMELICA

(Creado por Ley N° 25265)



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

TESIS:

**"Análisis de la Diversidad genética de 50 accesiones de habas (*Vicia faba L.*) mediante marcadores moleculares AFLP en la Región de Huancavelica"**

**LINEA DE INVESTIGACIÓN:**

Preservación de la Biodiversidad y el Ecosistema

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**Ingeniero Agrónomo**

**PRESENTADO POR LA BACHILLER**

**LUISA YANE MELGAR ÁVILA**

**HUANCAMELICA - 2012**

ACTA DE SUSTENTACION O APROBACION DE UNA DE LAS MODALIDADES DE UNA DE LAS MODALIDADES DE TITULACION

En la ciudad universitaria de "Común Era"; auditorio de la Facultad de Ciencias Agrarias, a los 22 días del mes de agosto del año 2012, a horas 10:00 am; se reunieron; el Jurado Calificador, conformado de la siguiente manera:

- Presidente** : Ing. Isaac Nolberto ALIAGA BARRERA.
- Secretario** : Mg.Sc.Ing. Julián Leonardo MANTARI MALLQUI.
- Vocal** : Ing. Leónidas LAURA QUISPETUPA.
- Accesitario** : Ing. Efraín David ESTEBAN NOLBERTO.

Designados con **RESOLUCIÓN N°313-2010-FCA-UNH**; del: proyecto de investigación o examen de capacidad o informe técnico u otros. Intitulado: "Análisis de la diversidad genética de 50 accesiones de habas (*Vicia faba L.*), mediante marcadores moleculares AFLP en la región de Huancavelica"

Cuyo autor es el graduado:

BACHILLER: MELGAR AVILA, Luisa Yane

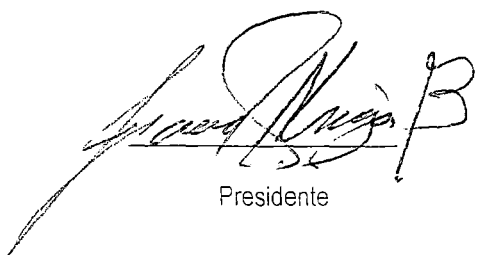
A fin de proceder con la evaluación y calificación de la sustentación del: proyecto de investigación o examen de capacidad o informe técnico u otros, antes citado.

Finalizado la evaluación; se invito al público presente y la sustentante abandonar el recinto; y, luego de una amplia deliberación por parte del jurado, se llegó al siguiente resultado:

APROBADO  POR UNANIMIDAD

DESAPROBADO

En conformidad a lo actuado firmamos al pie.

  
 Presidente

  
 Secretario

  
 Vocal

ASESOR

Mg.Sc.Ing. Rolando, PORTA CHUPURGO.✓

### DEDICATORIA

Al ser que en todo momento me da valor y firmeza  
y porque sé que si el está conmigo quien contra mí,  
a ti JEHOVA, a mis familiares por su apoyo.

## AGRADECIMIENTO

- Mg.Sc.Ing. Rolando, PORTA CHUPURGO, por su apoyo incondicional para la realización de mi proyecto de investigación
- Ph.D.Raul BLAS SEVILLANO, por su apoyo incondicional para la realización de mi proyecto de investigación
- Mg.Sc.Ing. Joel FLORES, por su apoyo incondicional para la realización de mi proyecto de investigación.
- Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria la Molina, por aceptar y acogerme durante el tiempo que duro mi proyecto de investigación
- A mis padres y familiares por su apoyo moral
- A todas las personas que han contribuido durante la realización del presente proyecto.

# ÍNDICE

	Pg.
Resumen	12
Introducción	13
<b>CAPÍTULO I: Problema</b>	15
1.1. Planteamiento del Problema	15
1.2. Formulación del Problema	16
1.3. Objetivos	16
1.3.1. Objetivo General	16
1.3.2. Objetivos Específicos	16
1.4. Justificación	16
<b>CAPITULO II: Marco Teórico</b>	17
2.1. Antecedentes	17
2.2. Bases Teóricas	21
2.2.1. Clasificación taxonómica	21
2.2.2. Origen, distribución e introducción en América.	22
2.2.3. Botánica del haba	23
2.2.4. Evaluación de diversidad genética	24
2.2.5. Mejoramiento genético asistido por métodos biotecnológicos	25
2.2.6. Marcador genético	25
2.2.6.1. Tipos de marcadores genéticos	25
2.2.7. Caracterización molecular	28
2.2.8. Base genética y detección de marcadores AFLP	29
2.2.8.1. Extracción del ADN genómico	31
2.2.8.2. Cuantificación y calidad del ADN	34
2.2.8.3. Electroforesis	36
2.2.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	37
2.2.9.1. Ventajas de los marcadores AFLP	38
2.2.9.2. Desventajas de los marcadores AFLP	38
2.2.10. Análisis de información	39

2.2.11. Unidad Taxonómica Operativa OTU	39
2.2.12. Caracteres	40
2.2.13. Datos del tipo doble estado y su codificación	41
2.2.14. Matriz básica de datos	41
2.2.15. Coeficiente de similitud	41
2.2.16. Elección del coeficiente de similitud	43
2.2.17. Matriz de similitud	44
2.2.18. Análisis de agrupamientos	45
2.2.19. Representación gráfica del análisis de agrupamiento	46
2.3. Hipótesis	47
2.4. Identificación de Variables	47
<b>CAPITULO III: Metodología de la Investigación</b>	48
3.1. Ámbito de estudio	48
3.1.1. Ubicación política	48
3.1.2. Ubicación geográfica	48
3.1.3. Factores climáticos	48
3.2. Tipo de Investigación	49
3.3. Nivel de Investigación	49
3.4. Método de Investigación	49
3.4.1. Material Vegetal	49
3.4.2. Extracción de ADN	50
3.4.3. Cuantificación y calidad del ADN	52
3.4.4. Desarrollo de la técnica de AFLP	55
3.4.5. Selección de combinaciones de iniciadores	59
3.4.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida	60
3.4.7. Tinción y revelado de geles de poliacrilamida	60
3.4.8. Escaneado y lectura (escoreo) de bandas	62
3.5. Diseño de Investigación	62
3.6. Población, Muestra, Muestreo	62
3.6.1. Población	52
3.6.2. Muestra	52

3.6.3. Muestreo	52
3.7. Técnicas e Instrumentos de Recolección de datos	63
3.8. Procedimiento de Recolección de Datos	63
3.8.1. Registro de datos	63
3.8.2. Obtención de la matriz de similitud	63
3.8.3. Conformación de grupos	64
3.9. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos	64
3.9.1. Análisis de Agrupamiento	64
3.9.2. Análisis de similaridad	64
<b>CAPÍTULO IV: Resultados</b>	65
4.1. Presentación de Resultados	65
4.2. Discusión	72
<b>CONCLUSIONES</b>	74
<b>RECOMENDACIONES</b>	75
<b>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA</b>	76
<b>ARTICULO CIENTIFICO</b>	79
<b>ANEXOS</b>	88



**INDICE DE CUADROS**

<b>Cuadro N°1.</b> Comparación de un carácter de doble estado de dos OTUs j y k.	Pg. 42
<b>Cuadro N°2.</b> Formula de Coeficiente de similitud de Dice y Sorensen.	43
<b>Cuadro N°3.</b> Coeficiente de similitud de Jaccard (Sneath).	43
<b>Cuadro N°4.</b> Coeficiente de similitud de Simple Matching.	44

## INDICE DE TABLAS

	Pg.
<b>Tabla N°1.</b> Material vegetal de haba	49
<b>Tabla N°2.</b> Composición del CTAB 2x	52
<b>Tabla N°3.</b> Composición del CTAB 10x	52
<b>Tabla N°4.</b> Componentes del Buffer TBE 10 X	54
<b>Tabla N°5.</b> Composición de Blue Juice	54
<b>Tabla N°6.</b> Reacción de digestión de ADN genómico	55
<b>Tabla N°7.</b> Ligación de Adaptadores	56
<b>Tabla N°8.</b> Reacción de Pre-Amplificación (+1/+1)	57
<b>Tabla N°9.</b> Reacción de pre- amplificación de PCR	57
<b>Tabla N°10.</b> Amplificación Selectiva (+3/+3)	58
<b>Tabla N°11.</b> Programa de amplificación selectiva -AFLP	59
<b>Tabla N°12.</b> Secuencia de iniciadores	59
<b>Tabla N°13.</b> Fijación del gel	61
<b>Tabla N°14.</b> Tinción del gel	61
<b>Tabla N°15.</b> Revelado del gel	61
<b>Tabla N°16.</b> Total de combinaciones de primers y el polimorfismo generado.	67

**INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura N°1.</b> Gel de agarosa al 1% observando el ADN y ARN	Pg. 54
<b>Figura N°2.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando la concentración y calidad del ADN extraído de las habas.	65
<b>Figura N°3.</b> Combinación E38-M59 Identificación de bandas monomórficas y polimórficas en gel de poliacrilamida.	66
<b>Figura N°4.</b> Dendograma que agrupa 50 accesiones de haba con 7 marcadores de AFLP a un coeficiente de 0,59.	68
<b>Figura N°5.</b> Dendograma que agrupa 50 accesiones de haba con 7 marcadores de AFLP a un coeficiente de 0,62.	70
<b>Figura N°6.</b> Dendograma que agrupa 50 accesiones de haba con 7 marcadores de AFLP a un coeficiente de 1,0	71

**INDICE DE ANEXOS**

	Pg.
<b>Anexo N°1.</b> Protocolo de Extracción con nitrógeno líquido establecido por Doyle & Doyle (1990), con algunas modificaciones.	89
<b>Anexo N°2.</b> Preparación del gel agarosa 1%.	90
<b>Anexo N°3.</b> Preparación de las muestras para la cuantificación y calidad del ADN.	91
<b>Anexo N°4.</b> Preparación del gel de acrilamida al 6%.	91
<b>Anexo N°5.</b> Matriz Básica de datos de 50 muestras de haba	92
<b>Anexo N°6.</b> Matriz de similitud de las 50 accesiones de haba analizada mediante AFLP.	103

## RESUMEN

Con la llegada de los españoles en el siglo XVI, se introdujo en el Perú una serie de especies agrícolas del continente Europeo entre ellas el cultivo de haba, con una variabilidad reducida que al cultivarse en los diferentes ecosistemas de la zona andina se diversificó, de esta manera ampliando la diversidad genética que se desconoce en su totalidad y por ello se procedió a realizar el análisis molecular de 50 accesiones de habas conservadas en el banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Huancavelica de la Facultad de Ciencias Agrarias, mediante marcadores moleculares AFLP para evaluar el grado de diversidad, se probaron 23 combinaciones de primers AFLP, de las cuales se emplearon 7 primers por presentar mayor polimorfismo. En este estudio se halló 139 bandas polimórficas, representando el 32.25% de polimorfismo. De acuerdo al dendograma obtenido a un coeficiente de similitud de 0,59 se formó dos grupos, que están diferenciados entre sí, el primer grupo constituido por 44 accesiones y el segundo grupo conformado por 6 accesiones presentando un grado de similitud entre las accesiones evaluadas. Según este análisis permitió la diferenciación del material estudiado observándose una diversidad genética y no encontrándose una duplicidad entre el germoplasma estudiado. Este trabajo corrobora la utilidad de la técnica de AFLP como herramienta para discriminar entre individuos altamente emparentados.

Palabras clave: Caracterización molecular, AFLP, *Vicia faba* L., diversidad genética

## INTRODUCCIÓN

El Perú posee una alta diversidad genética por ser uno de los centros mundiales de origen de la agricultura y la ganadería. Esta diversidad de especies cultivadas no es el resultado solamente de eventos biológicos, sino de la interacción, durante cientos de generaciones. **(Brackegg, 2000).**

El cultivo de haba (*Vicia faba* L.), es de gran importancia económica y social, ocupa el cuarto lugar a nivel mundial entre las leguminosas de grano, **(Pichardo, 2010)**, ya que es muy apreciada por sus cualidades alimenticias y nutritivas, puesto que provee proteínas y minerales en la dieta humana, y también usada como forraje y abono verde **(Vidal, 2005)**, así mismo contribuye al mejoramiento de los suelos, por su capacidad de fijar nitrógeno. El producto de este cultivo puede ser consumido en grano verde o seco.

Existen muchos tipos de habas en los países donde se cultiva, teniendo un buen rango de adaptación desde el nivel del mar hasta los 3.600 msnm sin ninguna dificultad **(Vidal, 2005)**. En el Perú se produce en los valles interandinos. A pesar de todas estas cualidades y ventajas, al cultivo de haba en el Perú, no se le ha prestado la atención que merece y su producción se ha mantenido casi estacionaria, con tendencia a decrecer, debido fundamentalmente a la ausencia de variedades mejoradas adaptadas al medio natural.

Inicialmente la diversidad genética se estudiaba mediante marcadores morfológicos, sin embargo en este tipo de estudios fenotípicos están influenciados por el medio ambiente y por el estado de desarrollo vegetal **(Quiroz et al., 1997)**; no obstante los marcadores moleculares presentan muchas ventajas, especialmente porque se trabaja directamente con el material genético (ADN) y se usan para mantener la identidad de las accesiones y los cambios genéticos que pueden ocurrir durante la conservación y regeneración para determinar duplicados y vacíos en los bancos de germoplasma, así como para determinar el grado de similitud entre individuos de una accesión o entre accesiones dentro de una colección y definir la estructura genética de individuos, accesiones, poblaciones o especies **(González y Pita, 2001)**.

En este trabajo se utilizó la técnica de AFLP porque presenta un alto poder de detección de la variabilidad genética. El objetivo fue evaluar el grado de diversidad genética de las

50 accesiones de habas (***Vicia faba* L.**), que cuenta el banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Agronomía de la Facultad de Ciencias Agrarias. El germoplasma del material estudiado forma parte de la diversidad genética por tener características de color y tamaño de la semilla (**Díaz y Ruiz, 2010**) esto es un indicio de la existencia de variabilidad es por ello que debe ser estudiado mediante marcadores moleculares, para una adecuada identificación y evitar la duplicación de las accesiones presentes en el banco de germoplasma. La aplicación de esta técnica ayuda en el agrupamiento de variedades semejantes de la especie a través de regiones específicas del genoma.

Para el éxito de cualquier programa de mejoramiento genético de plantas, este tipo de estudios permite entender mejor sobre la identidad y diversidad genética de las accesiones de ***Vicia faba* L.**, con las que se cuenta. (**Virk et al., 2000**).

## CAPÍTULO I: Problema

### 1.1. Planteamiento del Problema

La especie *Vicia faba* L., es una de las leguminosas más importantes a nivel mundial, debido fundamentalmente a la calidad y aceptación de su fruto tanto en verde como en grano seco, como consecuencia de su antigüedad ha estado sometida a un largo proceso de domesticación, durante el cual se han producido numerosos cruzamientos al azar. Es importante mencionar que el haba es una planta parcialmente alógama, lo cual es favorecido por la polinización cruzada y por lo tanto el flujo de genes entre diferentes genotipos, genera altos índices de diversidad (**Morillo et al., 2005**), esta gran diversidad está influenciado por el medio ambiente y que puede llevar a identificar a especies aparentemente iguales morfológicamente y a la presencia de duplicados en las colecciones, pero el uso de marcadores moleculares es más confiable, puesto que estos no están influenciados por el medio ambiente, nos permite conocer y caracterizar el contenido genético de los organismos, así como, estimar la diversidad y las relaciones genéticas entre grupos de interés. Los AFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados) son marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que tienen la capacidad de sintetizar millones de copias de un segmento específico de ADN, este tipo de marcador molecular representan una herramienta de gran precisión para la evaluación de diversidad genética y la determinación de la identidad de variedades. Considerando lo anterior, y tomando en cuenta que los marcadores Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP) permitirán tener una adecuada caracterización de la diversidad genética de habas, así también nos permitirá identificar si hay individuos duplicados.



## 1.2. Formulación del Problema

¿Los marcadores moleculares AFLP nos permitirá conocer la diversidad genética de las 50 accesiones de habas (*Vicia faba* L.)?

## 1.3. Objetivos

### 1.3.1. Objetivo General

Evaluar el grado de diversidad genética de las 50 accesiones de habas (*Vicia faba* L.), mediante marcadores AFLP.

### 1.3.2. Objetivos Específicos

- Determinar la similitud genética de las 50 accesiones de haba (*Vicia faba* L.)
- Identificar la duplicidad presentes en las 50 accesiones de haba. (*Vicia faba* L.)

## 1.4. Justificación

El cultivo de haba (*Vicia faba* L.), forma parte de los cultivos importantes en el Perú, su valor radica porque son una fuente importante de proteínas, carbohidratos, fibra, minerales y vitaminas para la alimentación de los habitantes del medio rural y en las ciudades. En la Escuela Académica Profesional de Agronomía de la Universidad Nacional de Huancavelica, desde el 2006 se ha evaluado morfológica y agrónomicamente 120 accesiones de haba (*Vicia faba* L.), procedentes de la cuenca del Mantaro (desde el Valle del Mantaro hasta el Valle de Huanta), sin embargo esta evaluación nos proporciona una estimación básica de las diferencias entre individuos. Es por ello que es necesario realizar un estudio de diversidad genética con marcadores moleculares AFLP debido a que se usan para determinar duplicados, mantener la identidad de las colecciones durante la regeneración, para determinar el grado de similitud entre individuos de una accesión o entre accesiones dentro de una colección (González y Pita, 2001).

## CAPÍTULO II: Marco Teórico

### 2.1. Antecedentes

Jordan (2011) utilizando RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) e ISSR (microsatélites), en la evaluación de taninos y caracterización molecular de variedades de haba (*Vicia faba* L.) cultivadas por agricultores, reportó que el desarrollo de este estudio se realizó en dos etapas, la primera consistió en la determinación del contenido de taninos y la segunda fue la caracterización molecular con marcadores RAPD e ISSR en 60 genotipos de haba. Las variedades de haba fueron colectadas en las regiones pertenecientes a Puebla, Oaxaca y Guerrero. En la caracterización molecular se probaron 34 iniciadores RAPD y 10 Microsatélites en los 60 genotipos de haba, de los cuales 16 RAPD amplificaron y solamente 6 de ellos se seleccionaron por presentar polimorfismo (OPA-14, OPAC-20, OPH-12, OPH-12, OPM-05, OPN-13 y OPF-13). Los iniciadores elegidos amplificaron un total de 24 bandas, de las cuales 16 fueron polimórficas esto representa un 66.6% de polimorfismo, en el caso de los microsatélites se evaluaron 10, los cuales amplificaron pero no presentaron polimorfismo, por lo que no se incluyeron en el análisis de diversidad. Con los marcadores RAPD se encontró variabilidad a nivel molecular entre las poblaciones de haba, en las que se definieron en total 9 grupos con un índice de similitud de 0.90, 4 grupos estuvieron integrados por una sola variedad. El grupo 1 con la V1 la cual es una variedad de ciclo entremedio y fue colectada en Puebla, el grupo 3 con la V33, es una variedad precoz que también pertenece a Puebla. El grupo 6 con la V8 es una variedad de ciclo intermedio perteneciendo al estado de Guerrero y el grupo 9 con la V70 es una variedad de ciclo intermedio pertenece al estado de Oaxaca, lo cual coincide con el estudio de una estructura poblacional de germoplasma de variedades andinas en frijol (Díaz, 2005).

Estos resultados mostraron un alto nivel de polimorfismo, argumenta que el polimorfismo genético, puede estar asociado con la naturaleza alógama de la especie, la cual tiende a favorecer la conservación de un alto porcentaje de heterocigotos.

**Ruiz (2009)** utilizando marcadores de Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP), en el análisis de la diversidad genética de *Phaseolus coccineus* L. De la sub-provincia Carso Huasteco de México, reportó que con la amplificación de cuatro combinaciones de oligonucleótidos AFLP se obtuvieron 256 bandas de las cuales 224 fueron polimórficas (87.4%) y 32 monomórficas (12.6%). El AMOVA encontró alta diferenciación genética entre las accesiones de frijol ayocote estudiadas pues el valor estudiado fue igual a 0.93; también se encontró la mayor proporción de varianza dentro de accesiones de Ayocote, más que entre accesiones, esto bien pudo deberse a la alogamia de la especie. El germoplasma con mayor índice de diversidad genética pertenece a las localidades de Ahuacatlan (50.0%) y mercado de Zacapoaxtla (55.8%), mientras que el germoplasma de Chignahuapan mostro el índice de diversidad menor (39.6%). Esta diferencia quizá se debió al movimiento de semilla por parte del hombre a través de ciertas localidades. El análisis de conglomerados con datos AFLP formo dos grupos de ayocotes y mostro que el germoplasma de frijol ayocote del Carso Huasteco es ampliamente diverso dado que no se observaron agrupamientos claros con base en el origen. Sin embargo, en el dendograma los testigos Pinto Villa, Pinto Zapata (*P.vulgaris*) (grupo A) fueron genéticamente distintos de *P.coccineus* (grupo B). El análisis de conglomerados de acuerdo con base en el origen indicó la formación de dos grupos de frijoles ayocotes; el primero (A) incluyo germoplasma de genética entre accesiones de frijol ayocote indica que el germoplasma once localidades y el otro (B) genotipos de Ahuacatlan y Xochiapulco. La alta diferenciación del frijol ayacote tiende al aislamiento reproductivo. Las localidades que presentaron los mayores valores de diversidad genética fueron Zacapoaxtla (56%) y Ahuacatlan(51%) y ello indica que existe el constante intercambio de materiales y la posible recombinación entre ello.

**Cruz et al., (2006)** utilizando marcadores RAPD en la evaluación agromorfológica y caracterización molecular de la ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.), reportó que en el análisis molecular del total de 36 iniciadores decaméricos probados, sólo el 17% presentó polimorfismo en las amplificaciones (seis iniciadores). Estos iniciadores generaron pocas bandas polimórficas (15 fragmentos), de tamaños variables de 200 a 2000 pb. Esto significa que la mayor parte del genoma de las entradas analizadas es más homogénea que heterogénea para el grupo de iniciadores utilizados. Esto, a pesar de que existen características morfológicas bastante diferentes, pero que genéticamente podrían estar muy relacionadas. Estos resultados no son concluyentes porque el número de iniciadores utilizados son muy pocos, así como el número de las entradas empleadas. Para la ñuña, por ser autógama, es recomendable trabajar con mayor número de marcadores y entradas para tener resultados más precisos.

Similares resultados han sido reportados en otras especies como la soya (*Glycine max* L.), en la que se encontró bajo nivel de polimorfismo, lo que indica que tiene una limitada diversidad genética en los cultivos tradicionales, lo cual hace la identificación de marcadores más difícil (**Khandka et al., 1996**). El PIC (contenido del índice de polimorfismo) varió entre 0.1 y 0.49. Según el índice del marcador RAPD, los iniciadores OPA-11, OPB-7, OPB-17 y OPA-10 son los mejores para detectar polimorfismo en ñuña, los que deberían ser usados de preferencia en futuras caracterizaciones de germoplasma. (**Cruz et al., 2006**).

En el dendrograma, en general tampoco se forman grupos según la procedencia. Esto indicaría que los genotipos bolivianos pueden estar muy relacionados con las entradas de ñuñas huanuqueñas, posiblemente debido al mismo tipo de faseolina que presentan algunas entradas de Huánuco con los genotipos boliviano y cajamarquino. Similares resultados se han obtenido en el agrupamiento con los marcadores agromorfológicos. Este resultado presenta la misma tendencia que lo reportado para frijol común de Nicaragua, analizando la diversidad genética con marcadores microsatélite y morfológico, donde las variaciones a nivel molecular fueron explicadas por diferencias dentro y entre las razas, pero no entre las zonas agroecológicas (**Gómez et al., 2004**).

Considerando coeficiente de similitud de 0.6, se forman dos grupos. El primer grupo está formado por cuatro entradas procedentes de Huánuco (UNALM-1, UNALM-7, UNALM-8 y UNALM-18). Estas entradas comparten caracteres morfológicos similares tales como: ancho, brillo, espesor, modelo, tipo de modelo y color de modelo de la cubierta de la semilla, días a la floración, días a la cosecha, peso de 100 semillas, tamaño y calidad de semilla (**Cruz et al., 2006**). El segundo grupo está formado por todas las 19 entradas restantes, provenientes de Perú (Cajamarca y Huánuco) y Bolivia, las que se caracterizan por presentar la misma coloración de grano, brillo y tamaño de semilla, porcentaje de expansión, calidad de grano, días a la cosecha y días a floración. Sin embargo, a un coeficiente de similitud de 1.0, todos son diferentes, no hay duplicados en el germoplasma analizado, confirmándose el agrupamiento previo con los marcadores agromorfológicos. (**Cruz et al., 2006**).

Según los dendrogramas obtenidos a través de la caracterización agromorfológica y molecular (RAPD), no hay congruencia entre ellas. Como, por ejemplo, en los agrupamientos según la caracterización molecular se observa que UNALM-15 con UNALM-19 se encuentran bastante distanciados a pesar de que éstos en la caracterización agromorfológica permanecen agrupados, ya que fenotípicamente presentan la misma forma, tamaño, color de granos, tienen los mayores volúmenes de expansión y calidad de grano reventado. Al respecto, **Crisci y López (1983)** manifiestan que nunca se obtiene una completa congruencia, pero tampoco una incompleta incongruencia, los valores varían según el grupo estudiado, características analizadas, método aplicado y forma en que se evalúa la congruencia. Existen causas biológicas y metodológicas como, por ejemplo, la diferencia de actividad de los genes en diferentes células de un organismo, plasticidad fenotípica, es decir, la posibilidad de que un mismo genotipo se exprese de distintas formas en ambientes diferentes, las mutaciones somáticas (dentro de un mismo individuo existen genotipos ligeramente diferentes); las causas metodológicas son aquellos pasos técnicos que pueden causar distorsiones como la determinación de homologías, la calidad y cantidad de características, la codificación, el tipo de evaluación de la congruencia, etc. (**Cruz et al., 2006**).

La caracterización molecular es más confiable que la caracterización morfológica, a pesar de ser muy pocos, puesto que estos no están influenciados por el medio ambiente, sin embargo en las entradas evaluadas aparentemente la diversidad molecular (genética) es menor que la diversidad morfológica. Este resultado confirma trabajos previos, **Beebe et al., (2001)** reportaron que a pesar de una vasta diversidad morfológica y de adaptación agroecológica existente en las variedades andinas de frijol común, éstas tienen una base genética muy estrecha según los marcadores AFLP. Esto implicaría que las variedades andinas se derivan de una o de muy pocas poblaciones silvestres, posiblemente fueron domesticadas en las faldas orientales de los Andes de Bolivia; además la variabilidad morfológica existente entre las variedades nativas sería resultante de la selección del agricultor. También, nuestro material genético analizado corresponde solamente a una pequeña parte de la diversidad del frijol común: las variedades de ñuñas. También en maní (*Arachis hypogea* L.) se ha reportado amplia variabilidad morfológica y una estrecha base genética (**Halward et al., 1992**). Por otro lado, en otros cultivos de la región andina, como en el caso de maíz (*Zea mays* L.), también existiría mayor diversidad fenotípica que genética, donde muchas variedades son distintas en sus caracteres morfológicos, pero están genéticamente muy relacionadas (**Blas et al., 2002**).

## 2.2. Bases Teóricas

### 2.2.1. Clasificación taxonómica

**Ríos (2003)** reporta que, la clasificación taxonómica del haba (*Vicia faba* L.) es de la siguiente manera:

Familia	: Papilionaceae
Tribu	: Vicieae
Género	: Vicia
Especie	: Vicia faba
Nombre científico	: <i>Vicia faba</i> L.
Nombre vulgar	: Haba

### 2.2.2. Origen, distribución e introducción en América.

**Cubero y Moreno (1983)** manifiestan que, las habas fueron unas de las primeras leguminosas domesticadas por el hombre desde que se inicio el nuevo régimen de vida que hoy conocemos como agricultura. A pesar de numerosos estudios, se sabe poco sobre el origen y la domesticación de haba, así postula que su centro de origen seria en el Oriente próximo y la zona mediterránea, con cuatro diferentes rutas que serian: Europa, a lo largo de la costa africana a España, a lo largo del Nilo en Etiopía y desde Mesopotamia a la India. Los centros secundarios de diversidad serian en Afganistán y Etiopía. Se considera que el cultivo tuvo su centro de origen en el próximo oriente desde donde ese extendió al mediterráneo y posteriormente al resto del mundo. *Vicia faba* L. es una excepción entre las leguminosas de grano ya que no se ha identificado su progenitor silvestre, no obstante, el grupo paucijuga, actualmente presente desde Afganistán a la india, es la forma primitiva considerada como más cercana al extinguido progenitor silvestre. Esta especie era conocida por los antiguos egipcios, griegos y romanos, y era consumida en grano verde y seco. Fue traída a América por españoles y portugueses en el siglo XVI. La distribución del cultivo por el mundo condujo a la selección para distintos factores adaptativos, distintos caracteres agronómicos relacionados con la arquitectura de la planta así como el tamaño, peso y forma de sus semillas. Hoy en día es cultivada en regiones templadas, subtropicales y en zonas altas de los trópicos de todo el mundo.

**Zohary (1970)** manifiesta que, el antepasado de *Vicia faba* L. fue la *Vicia galilea*; esto ayudó a predecir el lugar de origen, habiendo evidencias escritas para el cultivo temprano en la región del Asia Central. Según relatos, se sabe que las primeras descripciones del haba fueron hechas en la China (100 a.C.) y Japón (700 años d.C.). La primera descripción fue efectuada en Japón por tashikihan indica que el desarrollo de la cosecha toma lugar en 2 o 3 etapas. Las primeras variedades de semilla pequeña (*Vicia faba minor*) al parecer

seguido por las variedades de semilla grande (*Vicia faba major*) procedentes de la China en el siglo XVI.

**Bocanegra y Echandi (1969)** dicen que, el haba (*Vicia faba* L.) fue traída al nuevo continente en la época de la colonia. Llego a América en 1602 y fue cultivado por primera vez en la Costa Atlántica de los Estados Unidos de Norteamérica. Llego al Perú con los conquistadores, españoles, cultivada los primeros años en la costa, en donde no prospero, adaptándose mejor en la sierra peruana. Al principio se cultivo una variabilidad de formas, las cuales fueron seleccionadas de manera natural, quedando descartables los que no se adaptaron al lugar. Aparecieron nuevos tipos o formas de haba, diferente a los originales, las mismas que constituyen una fuente valiosa de genes posibles de selección.

### 2.2.3. Botánica del haba

**Rosas (1998)** menciona que, el haba actualmente se cultiva ampliamente en las regiones templadas y subtropicales. Las habas (*Vicia faba* L.) pertenecen a la familia de las Fabaceae y tienen muchos nombres comunes. Son nativas del norte de África y del suroccidente de Asia donde se las cultiva extensamente. La especie se extendió desde la región mediterránea hasta Europa y luego a través de Eurasia hasta partes del Nuevo Mundo. Las habas son una especie diploide,  $2n=12$  (seis pares homólogos), parcialmente alogama; se ha reportado polinización cruzada en esta especie en un rango de entre 8% y 84%, con un promedio del 35%.

**Cerrate (1981)** reportó que, *Vicia faba* L. es una planta anual, de consistencia herbácea erecta, de raíz profunda. Las flores son de color blanco, el fruto es una legumbre comprimida de color verde y cuando se seca cambia de tonalidad a negro. Las semillas son ovaladas aplanadas, de superficie lisa, opaca o brillante, de coloración muy variada, verde, coloreada, morada, parda, crema o marrón amarilla, también hay colores jaspeados y rayados, el número de semillas por vaina varía de 2 a 10, de tamaño variable, el peso de 100



semillas va desde 120 a 230 g. con base en el tamaño de las semillas las habas se clasifican en tres tipos: la variedad mayor de semillas grandes, la variedad equina de semillas medianas y la variedad menor de semillas pequeñas.

#### 2.2.4. Evaluación de diversidad genética

**Sevilla y Holle (2004)** mencionan que, la variación entre poblaciones de una especie más la variación dentro de poblaciones es la diversidad genética total de una especie. Los individuos de una especie difieren entre sí en muchas características que tienen causas genéticas y ambientales. El conocimiento de la base genética de las diferencias es indispensable para entender la diversidad genética, pre-requisito para colectarla, conservarla, caracterizarla y utilizarla. Es mucho más difícil estimar la diversidad de una especie que la variabilidad de características específicas dentro de variedades o poblaciones. No es posible estimar la diversidad genética en términos estadísticos o cuantitativos y en general lo que se hace es clasificar la especie en categorías intraespecíficas como razas, ecotipos, morfotipos y variedades; la diversidad genética relativa de una especie en una región se da en términos del número de categorías intraespecíficas.

**Rafalski (2002)** manifiesta que, para estimar la diversidad genética de los cultivares se utilizan varios métodos, basados en la morfología, en el pedigrí y en el uso de marcadores moleculares, cuyo uso ha aumentado últimamente. La identificación basada en caracteres morfológicos, a pesar de ser ampliamente usada, ha resultado ineficiente en genotipos altamente emparentados, donde las características varietales diferenciales son escasas, además de ser altamente influenciadas por el ambiente, y requerir de evaluaciones en campo que ameritan considerable gasto de dinero, tiempo y espacio. Comparados con los análisis morfológicos, los marcadores moleculares pueden revelar diferencias entre accesiones a nivel de DNA proveyendo un método más directo, confiable, y una herramienta eficiente para la conservación y manejo del germoplasma.

### 2.2.5. Mejoramiento genético asistido por métodos biotecnológicos

**Virk et al., (2000)** mencionan que, el éxito de cualquier programa de mejoramiento genético de plantas es asegurado en gran medida por la selección de los progenitores que forman la población base que da inicio al programa de selección. Tales poblaciones deben contener una amplia variabilidad genética, por lo que es importante conocer las relaciones genéticas entre las líneas utilizadas como progenitores. Este conocimiento sobre métodos biotecnológicos ha tenido un impacto significativo en el mejoramiento de plantas, siendo la información generada útil tanto en la planificación de cruces para la obtención de híbridos y desarrollo de líneas, como en la asignación de líneas a grupos heteróticos y en la protección varietal.

### 2.2.6. Marcador genético

**Picca et al., (2004)** mencionan que, es cualquier característica física o molecular heredada que difiere entre individuos y que puede ser detectado fácilmente.

**2.2.6.1. Tipos de marcadores genéticos:** La clasificación de marcadores genéticos se dividen en tres:

#### **a) Marcadores morfológicos**

Son características fenotípicas de fácil identificación visual tales como forma, color, tamaño o altura. Muchos de ellos se convierten en importantes «descriptores», a la hora de inscribir nuevas variedades. Este tipo de marcadores contribuyó significativamente al desarrollo teórico del ligamiento genético y a la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos. Las características morfológicas controladas por un solo locus pueden ser usadas como un marcador genético si su expresión es reproducible en un amplio rango de ambientes. Aunque los marcadores morfológicos son codominantes y han sido útiles para predecir la respuesta genética a seleccionar, ellos pueden ser influenciados por el medio ambiente y por factores

genéticos, como la epistásis. Las principales limitaciones de los marcadores morfológicos se encuentran en:

- Número reducido de marcadores disponibles en cada población.
- Bajo nivel de polimorfismo.
- Pueden producir alteraciones fenotípicas que dificultan el desarrollo de la planta.
- Varias características se hallan bajo control poligénico
- Dominancia
- Muchos de ellos se expresan en la etapa de planta adulta, lo cual prolonga los tiempos de evaluación en los programas de mejoramiento.

El hecho de que varios factores puedan modificar la expresión del gen limita su utilidad como marcador genético. Los marcadores morfológicos permanecen como caracteres útiles en la identificación de materiales dado que representan un conjunto de genes que pueden ser evaluados con métodos sencillos y a bajo costo.

#### **b) Marcadores Bioquímicos (isoenzimáticos)**

Las isoenzimas son gobernadas por genes simples mendelianos con alelos codominantes. Pueden ser analizados de una gran variedad de órganos y tejidos. A diferencia de las proteínas son fáciles de interpretar en términos de alelos por locus. Las isoenzimas son enzimas que tienen similar actividad enzimática pero diferente estructura química. Son formas moleculares distintas de una enzima. Todas esas formas catalizan el mismo sustrato, pero son codificadas por diferentes genes. Si son codificadas por diferentes alelos de un mismo locus simple, las isoenzimas se denominan aloenzimas. Generalmente las diferencias estructurales entre éstas son sólo un simple aminoácido en la estructura primaria de proteína. Las aloenzimas se detectan por movilidad electroforética, la diferencia en

movilidad electroforética es consecuencia de diferencias en aminoácidos de las enzimas, el producto afecta la enzima se deposita en un gel de almidón formando una banda. La intensidad y localización de la banda depende del alelo específico. La composición aloenzimática de un individuo en un locus dado es determinada en el laboratorio por separación electroforética de las varias formas alélicas. El tamaño específico y la carga eléctrica total son únicos para cada alelo. Variantes alélicas son codificadas midiendo su distancia relativa de migración dentro del gel. Las isoenzimas han tenido un rol prominente en estudios de poblaciones vegetales para determinar variabilidad y estructura genética, sistemática y biología evolutiva así como en descripción de germoplasma e identificación de variedades. Por otro lado, las formas enzimáticas extraídas de hoja o raíz (no así las de semilla) presentan variaciones en relación a las condiciones ambientales de crecimiento y a la edad del tejido, lo cual afecta la reproducibilidad de los zimogramas y es necesario hacer uso de tejido fresco o congelado apropiadamente para mantener la actividad enzimática. No obstante, estos loci representan importantes marcas de referencia para relacionar mapas obtenidos a partir de distintos marcadores de ADN.

### **c) Marcadores moleculares**

**González y Pita (2001)** definen, como marcador molecular a: "Secuencia de ADN que puede ser fácilmente detectable y cuyo mecanismo hereditario puede ser manipulado. Un marcador de ADN es simplemente un punto de referencia en un cromosoma, que puede o no corresponder a un gen. Se define también como marcador molecular a todo y cualquier fenotipo molecular oriundo de la expresión de un gen o de segmentos específicos de ADN, que puede ser detectado y su herencia monitoreada incluye toda técnica que implique la utilización de fragmentos o secuencias del ADN para determinar las variaciones o polimorfismos de uno o varios individuos o

poblaciones. Los marcadores moleculares, son los métodos biotecnológicos que se usan para identificar variedades protegidas. Se consigue con ello genotipificar las variedades que se desean proteger. Actualmente se han convertido en una herramienta muy útil para la conservación del germoplasma y para facilitar su uso y manejo. Se usan para determinar la identidad de las accesiones y los cambios genéticos que pueden ocurrir durante la conservación y regeneración; para asegurar la representatividad y el tamaño de la muestra, para determinar duplicados y vacíos en los bancos de germoplasma, para mantener la identidad de las colecciones durante la regeneración, para determinar el grado de similitud entre individuos de una accesión o entre accesiones dentro de una colección; para definir la estructura genética y la variación de individuos, accesiones, poblaciones o especies; para formar las colecciones núcleo, para caracterizar y clasificar el germoplasma. En comparación con los caracteres morfológicos los marcadores moleculares tienen muchas más ventajas, y su expresión es independiente de las condiciones ambientales. Los marcadores moleculares pueden ser clasificados en dos grupos:

a) Marcadores basados en la hibridación del ADN:

- RFLP «Restriction Fragment Length Polymorphisms»
- Minisatélites ó VNTR «Variable Number of Tandem Repeats»

b) Marcadores basados en la amplificación del ADN:

- AFLPs «Amplified Fragment Length Polymorphisms»
- RAPDS « Random Amplified Polymorphic DNAs»
- Microsatélites ó SSR «Simple Sequence Repeats»

### 2.2.7. Caracterización molecular

**Sneath y Sokal (1973)** indican que, la caracterización es el acto de determinar los atributos peculiares de alguien o de algo, de modo que claramente se distinga de los demás. Para este estudio el carácter es cualquier propiedad o

atributo que varía en la Unidad Taxonómica Operativa (OTU) en estudio y los posibles valores que ése carácter pueda presentar se les considera sus estados.

**Velasco (2005)** señala que, los marcadores moleculares revelan sitios de variación a nivel de secuencia de ADN, a diferencia de los marcadores controlados por genes asociados a caracteres morfológicos, las variaciones en los marcadores de ADN no se muestran por sí mismas en el fenotipo, porque pueden ser diferencias en un solo nucleótido del gen o en un pedazo de ADN repetitivo. Los marcadores moleculares relacionados a una característica específica son de particular interés porque permiten identificar individuos que contengan esa característica y diferenciarlos de los que no la posean, es decir que dan información sobre la diversidad genética. Los marcadores moleculares presentan muchas ventajas en comparación con los marcadores genéticos de tipo morfológico, especialmente por su alto número y su independencia de los efectos del medio ambiente. Los marcadores permiten revelar las diferencias que existen entre los genomas como producto del proceso evolutivo, como aplicaciones de estas técnicas se puede mencionar la definición de grupos genéticos a nivel intraespecífico (entre la misma especie) y la organización filogenética de las especies (las relaciones evolutivas entre distintas especies).

#### **2.2.8. Base genética y detección de marcadores AFLP**

**Zabeau (1993)** reporta que, el análisis de AFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados) representa la tecnología más reciente para la obtención de un gran número de marcadores moleculares distribuidos en genomas de procariontes y eucariontes. El ensayo de AFLP combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción con la velocidad y practicidad de detección de polimorfismo vía PCR. Desde su desarrollo y divulgación (**Zabeau, 1993**), esta técnica ha sido utilizada de forma creciente para diversas finalidades, tales como: mapeamiento genético localizado y construcción de mapas genéticos,

principalmente en especies de plantas cultivadas que presentan una baja tasa de polimorfismo de ADN.

**Powell et al., (1996)** señalan que, el análisis de AFLP consta esencialmente de cuatro etapas. En la primera etapa el ADN genómico total del individuo es cortado con dos enzimas de restricción. En la segunda etapa, se incorporan adaptadores específicos a los extremos de los fragmentos genómicos generados por la digestión enzimática. En la tercera etapa, una fracción de los fragmentos generados es amplificada selectivamente vía PCR utilizando "primers" específicamente diseñados para reconocer las secuencias en los adaptadores. En la cuarta y última etapa, la subpoblación de fragmentos amplificados es separada en geles de alta resolución. La etapa de digestión del ADN genómico se realiza con una enzima de corte raro, combinada con una enzima de corte frecuente. Las enzimas de corte raro reconocen de 6 a 8 pares de bases o una secuencia rara de bases (ej.:Eco RI, NotI) y las de corte frecuente reconocen 4 pares de bases (ej.: MseI, RsaI). Las reacciones se realizan separadamente, tratando primero el ADN con la enzima de corte raro y después con la de corte frecuente. Con esta digestión secuencial se generan 3 clases de fragmentos que difieren en cuanto a las extremidades:

(1) Fragmentos grandes resultantes de la digestión por la enzima rara en ambos extremos; (2) fragmentos pequeños resultantes del corte con la enzima frecuente en ambos extremos; (3) fragmentos de tamaños intermedios resultantes del corte combinado de ambas enzimas, rara/frecuente. La segunda etapa consiste en la incorporación de adaptadores específicos que poseen terminales complementarios a los extremos resultantes del corte con las enzimas de restricción. Por ejemplo, los adaptadores EcoRI específicos se unen a los extremos "adhesivos" producidos por la EcoRI, mientras que los adaptadores MseI se unen específicamente a los extremos resultantes del corte con la enzima MseI. Los adaptadores poseen de 20 a 30 pares de bases cuyas secuencias son diferentes en cada uno de ellos. En este paso, podría ser amplificado un gran número de fragmentos mediante una PCR dirigida con

"primers" específicos a partir de las secuencias de los adaptadores. Sin embargo, este número sería excesivamente grande para obtener una buena definición de fragmentos individuales, inclusive en geles de alta resolución. Por lo tanto, son necesarias algunas etapas de selección de una subpoblación de fragmentos hasta llegar a un número tal que sea posible visualizarlos convenientemente en un gel. La tercera etapa consiste en la selección de los fragmentos que serán amplificados. Esta se realiza mediante una estrategia basada esencialmente en el concepto de los polimorfismos RAPD, o sea, la utilización de "primers" de secuencia arbitraria. Los "primers" utilizados para dirigir la PCR están contruidos de tal forma que, además de la secuencia específica de 20 a 25 nucleótidos complementarios a la secuencia de los adaptadores, contienen de 1 a 3 nucleótidos adicionales de secuencia arbitraria en su extremo 3'. Con esto, los "primers" hibridarán solamente con aquellos fragmentos que posea la secuencia complementaria de su secuencia arbitraria adicional. Por lo tanto, se produce una acción selectiva en el momento en que es realizada la PCR y solamente una subpoblación de fragmentos es amplificada

#### **2.2.8.1. Extracción del ADN genómico**

**Rocha (2002)** reporta que, el aislamiento o purificación de ADN es el primer paso a desarrollar en muchos de los estudios y técnicas de biología molecular, por lo tanto el método de extracción que ha de emplearse debe ser el más apropiado para el laboratorio, menciona que para la extracción del ADN vegetal es necesario tener en cuenta lo siguiente:

- a) El tipo de planta y de tejido que se va a emplear como fuente. Por ejemplo, los tejidos jóvenes contienen más ADN que los tejidos viejos. Además, es necesario considerar la composición bioquímica de los tejidos. Por ejemplo, el método de extracción del material genético proveniente de tejidos ricos en compuestos fenólicos es



diferente al método empleado con tejidos ricos en carbohidratos o aceites.

- b) El tipo de ADN que se va a extraer. Las plantas poseen tres tipos de ADN: el nuclear, el mitocondrial y el cloroplástico. Los distintos tipos de ADN tienen características bioquímicas semejantes. Sin embargo, el tipo de información biológica que codifican es completamente diferente.
- c) El tipo de análisis a realizar. Con base en la cantidad y la calidad del ADN se pueden desarrollar diversas técnicas de análisis, tales como: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), secuenciación, etc.

El objetivo principal de un procedimiento de extracción es obtener un ADN de buena calidad y cantidad. La calidad se refiere a la posibilidad de almacenar el ADN por tiempo indefinido, manteniendo su estructura y propiedades; por lo que es la calidad del ADN el factor responsable de la reproducibilidad en experimentos posteriores. La cantidad, por su parte, es un concepto relativo que depende, entre otros, del número y estado de las células propias del tejido a estudiar. Por lo tanto, como regla general, un buen método de extracción debe mantener la integridad física y bioquímica del ADN e incrementar sus rangos de pureza y concentración.

**Rogers y Bendich (1988)** mencionan que, en plantas existen múltiples protocolos para extraer y purificar el ADN genómico; sin embargo todos estos procedimientos incluyen los siguientes pasos:

- a) Ruptura de tejidos y paredes celulares. Este paso consiste en pulverizar el material vegetal a bajas temperaturas, generalmente empleando nitrógeno líquido o hielo seco. También existe la

pulverización en seco, un proceso en el cual los tejidos se deshidratan por secado en un horno o con silicagel. Además también se pueden hacer trituraciones mecánicas sin nitrógeno líquido.

- b) Ruptura de la membrana celular y nuclear para liberar el ADN hacia el buffer de extracción. Una vez que el tejido es disgregado en células, se hace necesario romper las membranas celulares para liberar el ADN. Esto puede ser llevado a cabo químicamente con detergentes; por ejemplo: SDS (dodecilsulfato sódico), Triton X-100, CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetil amonio) o detergentes comerciales.
- c) Inhibición de enzimas que destruyen el ADN. Como un mecanismo de defensa natural, las células contienen enzimas que destruyen el ADN (ADNasas). Estas enzimas deben ser inactivadas para garantizar la calidad de las preparaciones de ADN. La inhibición puede realizarse mediante métodos físicos, tales como desnaturalización por calor (temperaturas de 65° C) o con métodos químicos. Estos últimos incluyen tratamiento con solventes orgánicos (fenol y cloroformo), con antioxidantes (Dithiothreitol y  $\beta$ -mercaptoetanol), con agentes quelantes como EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) que captura los iones magnesio necesarios para la funcionalidad de las ADNasas, o con agentes caotrópicos que actúan removiendo el agua estructural de las proteínas. Por lo general se utilizan mezclas de varios de estos reactivos para asegurar la inhibición de tales enzimas.
- d) Extracción de contaminantes. El objetivo de extraer ADN es obtener preparaciones enriquecidas en esta molécula. Sin embargo, el ADN está asociado con proteínas (histonas) e inmerso en un medio que contiene estructuras de composición química diversa. Las metodologías para retirar los contaminantes de una preparación de ADN incluyen: la centrifugación a altas velocidades,

la electroforesis, la separación a través de columnas e incluso la utilización de imanes (biomagnética) para obtener preparaciones de alta pureza.

**Rocha (2002)** menciona que, el ADN además de ser una molécula de alto peso molecular, muy larga y delicada, es un ácido capaz de formar sales con iones cargados positivamente (cationes). Además, es soluble en soluciones concentradas de sales (cloruro de sodio, por ejemplo), pero insoluble en alcoholes (tipo etanol o isopropanol). Adicionalmente, el ADN es destruido (depurinado) a pH ácido (menor de 4,0), es insoluble a pH 5,6 pero es soluble a pH 8,0. Por lo tanto, los procesos de extracción, purificación y almacenamiento del ADN deben mantener el pH óptimo y brindar una alta concentración iónica.

#### **2.2.8.2. Cuantificación y calidad del ADN**

**Ferreira y Grattapaglia (1998)** mencionan que, varias son las técnicas utilizadas en la cuantificación del ADN. Algunas dependen del empleo de equipamientos muchas veces costosos, como espectrofotómetros, mientras que otras menos precisas, son sencillas y baratas. La opción por uno u otro método depende básicamente de la condición del laboratorio. Dos técnicas bastante utilizadas en la cuantificación del ADN para análisis de AFLP, RFLP y RAPD son las realizadas mediante fluorímetro o por comparación de los fragmentos en geles coloreados con bromuro de etidio. La cuantificación mediante fluorímetro se basa en la adición de un compuesto (DAPI: 4', 6-diamino-2fenilindol) a la solución de ADN y en la cuantificación del ADN según la emisión de fluorescencia del compuesto. El DAPI es un compuesto que se une a la molécula del ADN como una sonda y que emite fluorescencia al ser excitado por el haz de luz del fluorímetro, cuanto mayor es la fluorescencia emitida, mayor es la concentración de ADN y por tanto, mayor la concentración de ADN. La concentración más elevada de la muestra de ADN patrón se utiliza para acertar la

escala arbitraria del fluorímetro en la posición máxima y se utilizan disoluciones proporcionales de la misma, para obtener otros puntos en la escala en la lectura del fluorímetro. Una vez obtenida una curva de calibración de valor del fluorímetro respecto a la concentración de muestra patrón de ADN se prosigue a la lectura de los valores de las muestras de ADN que se desea cuantificar. Por fin los valores obtenidos en la escala del fluorímetro son transformados en  $\mu\text{g/ml}$  de ADN según la curva patrón. Otra técnica bastante sencilla, utilizada en la cuantificación de ADN es el análisis comparativo de muestras coloreadas con Bromuro de Etidio en geles de agarosa. La técnica consiste simplemente en la utilización de una secuencia ascendente de concentraciones de solución patrón de ADN coloreadas lado a lado en el gel de agarosa, con el que se compara una muestra de ADN de concentración desconocida. La técnica presenta algunas variaciones que se basan en la electroforesis del ADN patrón y de la muestra de concentración desconocida en geles de agarosa. El cálculo de las concentraciones de las bandas se hace bajo luz ultravioleta según la fluorescencia. Esta variación es la más adecuada para la cuantificación, pues ocurre la separación del ADN y del ARN durante la electroforesis y se reduce la imprecisión del proceso de cuantificación cuando el ácido nucleico analizado presenta contaminantes que se unen al bromuro de etidio. La visualización del ADN se hace directamente en un gel de agarosa que contiene bromuro de etidio, colorante fluorescente que se intercala entre las dos hebras del ADN y emite una señal en presencia de luz UV, que es proporcional a la cantidad de ADN en la muestra. Para la determinación de la calidad del ADN se precisa la observación de bandas íntegras que corresponden a un ADN no degradado y en caso contrario cuando se observa un barrido (smear), este corresponde a un ADN degradado de mala calidad, no apto para su utilización de diversas técnicas moleculares. El cálculo de la concentración de ADN en las soluciones probadas, se

realiza mediante la observación de la fotografía del gel en presencia de luz ultravioleta o de la imagen digitalizada del propio gel cuando es posible el uso de sistemas más sofisticados de integración de datos. Es de extrema importancia evitar la cuantificación por observación directa de las bandas bajo luz ultravioleta, incluso con máscaras de protección. Una cuantificación más precisa, se realiza comparando la intensidad de la banda del ADN con la primera banda del marcador de peso molecular (ADN del fago lambda  $\lambda$  cortado con la enzima *Pst* I), cuyo tamaño es de 14800 pb y su intensidad corresponde a una concentración de 280 ng/ul.

### 2.2.8.3. Electroforesis

**Freifelder (1991)** reporta que, la electroforesis es la migración de partículas cargadas a través de un soporte, las cuales están sometidas a un campo eléctrico. Los materiales para la matriz más utilizados en la electroforesis son la poliacrilamida, la agarosa y el almidón. Los geles de agarosa y poliacrilamida pueden prepararse en una variedad de formas, tamaños y porosidades y pueden ser corridos en varias configuraciones diferentes. Las elecciones de estos parámetros depende principalmente del tamaño de fragmentos que se van a separar. Los geles de agarosa (de 0.8% a 2.0%) son muy útiles para separar fragmentos de ADN cuyo tamaño esté comprendido en el intervalo de 300 a 10.000 pb. tienen menor poder de resolución que geles de poliacrilamida pero tienen un mayor rango de separación. Los geles de agarosa se corren usualmente en una configuración horizontal en un campo eléctrico de carga y dirección constante. Los geles de poliacrilamida (de 3.5% a 20%) son muy útiles para fragmentos cuyo tamaño oscile entre 20 y 1000 pb. Su poder de resolución es extremadamente alto y fragmentos de ADN que difieren en tamaños más pequeños como 1 pb pueden ser separados el uno del otro. Aunque pueden correrse muy rápidamente y pueden ser

colocados grandes numerosas muestras de ADN, los geles de poliacrilamida tienen la desventaja de ser más difíciles de preparar y manejar que los geles de agarosa. Generalmente se corren en una configuración vertical en un campo eléctrico constante. Los geles se someten a un campo eléctrico que hace migrar los fragmentos de ADN según su tamaño, de modo que los fragmentos grandes migran más lentamente que los fragmentos cortos. Las moléculas de ADN, que están cargadas negativamente a pH neutro, migran hacia el ánodo. La visualización de los fragmentos de ADN, después de la electroforesis en geles de agarosa, se logra mediante la tinción con bromuro de etidio; las moléculas de esta sustancia se colocan entre las bases del ADN y producen una fluorescencia de color anaranjado bajo la luz ultravioleta.

### **2.2.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

**Ferreira y Grattapaglia (1998)** señalan que, la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa, fue concebida por Kary Mullis a mediados de la década del 80. La PCR es una técnica que comprende la síntesis enzimática in vivo de millones de copias de un segmento específico de ADN en presencia de la enzima ADN polimerasa. La reacción de PCR se basa en el apareamiento y la polimerización enzimática de un par de oligonucleótidos utilizados como cebadores que delimitan la secuencia de ADN de doble cadena que es blanco de la amplificación. Estos cebadores son sintetizados artificialmente de manera que sus secuencias de nucleótidos sean complementarias a las secuencias específicas que flanquean la región blanco. Muchos métodos tradicionales de clonación, secuenciación y análisis de polimorfismos de ADN fueron acelerados o sustituidos por el uso de numerosas derivaciones de la técnica de PCR. La introducción de esta tecnología permitió nuevas posibilidades para la detección del polimorfismo genético que se observa debido a que la variación en la secuencia del genoma altera los sitios de reconocimiento del cebador.

### 2.2.9.1. Ventajas de los marcadores AFLP

- a) No requiere un conocimiento previo de las secuencias del genoma (anónimos), ni hay que generar sondas de hibridación.
- b) Las regiones que analizan están distribuidas por todo el genoma.
- c) Altamente reproducibles.
- d) Produce patrones de bandas muy claros con alta resolución.
- e) Son marcadores dominantes, pero genotipos homocigotos o heterocigotos se diferencian por la intensidad de las bandas amplificadas, esto quiere decir que la determinación genotípica se basa en la cuantificación de las bandas.
- f) Puede generar muchos marcadores con pocos primers.
- g) Versátiles: distintas enzimas e iniciadores selectivos.
- h) Son marcadores altamente polimórficos.
- i) Mayor eficiencia (nº bandas/reacción). Una "huella identificadora", característica de AFLP contiene entre 50 a 100 fragmentos amplificados (banda), ya que cada marcador es sumamente informativo.
- j) Los marcadores obtenidos son sumamente confiable y sólidos, y no son afectados por las pequeñas variaciones del proceso de amplificación.

### 2.2.9.2. Desventajas de los marcadores AFLP

- a) Se necesita ADN de buena calidad (integridad) y en cantidades entre 0.3 y 1.0 µg por reacción
- b) Herencia dominante.
- c) En los mapas genéticos, los AFLP se agrupan, con frecuencia, en los centrómeros y telómeros.
- d) La incertidumbre acerca de la homología de los fragmentos amplificados de igual peso molecular.
- e) Los AFLP generan cantidades enormes de información, por lo que pueden requerir un análisis automatizado.

- f) El sistema es costoso en cuanto a implementación e infraestructura, y requiere de personal especializado, especialmente, en el análisis de los datos.

**2.2.10. Análisis de información**

**Crisci y López (1983)** mencionan que, los datos resultantes a partir de la aplicación de los marcadores moleculares pueden ser evaluados como unidades taxonómicas para encontrar las diferencias y afinidades correspondientes. Los pasos elementales comunes en la mayor parte de las técnicas numéricas, se mencionan a continuación:

- a) Elección de las unidades: Se eligen a las Unidades Taxonómicas Operativas (OTU), quienes serán las unidades a clasificar.
- b) Elección de los caracteres: Se eligen los caracteres que escriben a las OTUs y se registran sus estados.
- c) Construcción de una matriz básica de datos (MBD) de cada OTU por estado de los caracteres.
- d) Obtención de un coeficiente de similitud para cada par posible de OTU. A base de la MBD y eligiendo un coeficiente adecuado, se calcula la similitud para cada par posible de OTUs.
- e) Construcción de una matriz de similitud. Se construye una matriz de similitud con los datos obtenidos del paso anterior OTU por OTU.
- f) Conformación de Grupos: Con los datos de la matriz de similitud del paso anterior y mediante la aplicación de distintas técnicas (ejemplo, análisis de agrupamiento) se obtiene la estructura taxonómica del grupo de estudio.
- g) Generalizaciones: Se formulan las generalizaciones acerca de los taxones, tales como: elección de caracteres discriminatorios, relación entre organismos, inferencia acerca de los taxones, etc.

**2.2.11. Unidad Taxonómica Operativa OTU**

**González y Pita (2001)** reportan que, las siglas OTU son el acrónimo de *Operational Taxonomic Unit*, en español Unidad Taxonómica Operativa.



Dicho de una manera práctica son las unidades en estudio. El rango taxonómico de estas dependerá del objetivo del estudio si se quieren caracterizar todas las accesiones de una misma especie existente en un banco de germoplasma, con el fin de estudiar si existen duplicados, homónimos o sinónimos, cada una de las accesiones será una OTU, si por el contrario lo que se quiere analizar es la variabilidad interpoblacional de una determinada especie, las OTUs serán cada una de dichas poblaciones. En este caso como lo que interesa analizar es la variedad intrapoblacional, la OTU sería el individuo.

#### a) Elección de OTU

Se eligen los organismos a estudiar y se definen las unidades a clasificar denominadas OTUs

### 2.2.12. Caracteres

**Sneath y Sokal (1973)** definen, el carácter como cualquier propiedad que varía en las OTUs en estudio. La clasificación se hace en base a un gran número de caracteres morfológicos, fisiológicos, adaptativos, anatómicos, citológicos, etc. Cuando se incluyen marcadores moleculares que identifican porciones del ADN de los individuos, se toma en cuenta las relaciones genealógicas en el entendido que la similitud en el ADN es la mejor evidencia de semejanza filogenético.

**Sevilla y Holle (2004)** mencionan que, la clasificación biológica es más real, o sea los grupos separan a individuos realmente distintos, cuando los caracteres diferenciales están gobernados por muchos genes; en términos moleculares eso significa que el ADN de los individuos separados en grupos distintos debe ser más diferente que el ADN de individuos localizados en el mismo grupo. No basta que los individuos sean fenotípicamente distintos porque si el carácter está gobernado por un solo gen, la diferencia en el ADN de individuos diferentes es mínima.

a) Elección de caracteres

**Sneath y Sokal (1973)** reportan que, la caracterización debe llevarse a cabo utilizando el mayor número de caracteres posibles. Se eligen los caracteres que describan a las OTU y se registra el estado de los caracteres presentes en ellas. El número de caracteres posibles es casi ilimitado y, por lo tanto, desde el punto de vista estadístico no puede sostenerse que el conjunto de todos los caracteres posibles forman una población al azar.

**2.2.13. Datos del tipo doble estado y su codificación**

**Crisci y López (1983)** mencionan que, son aquellos datos que solo presentan dos estados (datos binarios o predicados dicotómicos), pudiendo indicar presencia/ ausencia o estados excluyentes. Numéricamente, se expresan como 1 (presencia) y 0 (ausencia), pudiendo ser expresados además como + (presencia) y - (ausencia) o cualquier otra forma convencional.

**2.2.14. Matriz básica de datos**

**González y Pita (2001)** reportan que, la matriz básica de datos (MBD) es una matriz rectangular, colocando en filas las OTUs y en columnas los caracteres analizados. Por tanto la matriz recoge el valor de cada carácter en cada una de las OTU. En el caso de que exista variabilidad intra-OTU se tomará como valor representativo de cada carácter en cada OTU.

**2.2.15. Coeficiente de similitud**

**Crisci y Lopez (1983)** indican que, el parecido o similitud es cuantificable aplicando un coeficiente de similitud. Con el uso de los coeficientes en operaciones matemáticas pueden calcularse las similitudes (distancia) respecto a cada par posible de OTU de una matriz básica de datos. Existen diferentes tipos de coeficientes basados en fundamentos matemáticos.

- a) Coeficientes de distancia: Se aplican sobre matrices básicas que presentan dato doble-estado o multiestados, o en las que poseen ambos tipos de datos (datos mixtos)
- b) Coeficientes de correlación: Calcula la similitud midiendo la separación angular formada por las dos líneas que parten del origen de las coordenadas y pasan por las OTU  $j$  y  $k$ . Los coeficientes de correlación son funciones de esos ángulos.
- c) Coeficientes de Asociación: Miden la similitud entre cada par de individuos a partir de la información que proporcionan los caracteres medidos sobre los mismos. El coeficiente de asociación mide las coincidencias y diferencias en los caracteres entre dos OTUs, cuando éstos tienen sólo dos estados para cada característica. Los estados son, presencia (codificado con 1) o ausencia (codificado con 0). Si se compara un carácter de doble estado de dos OTUs  $j$  y  $k$ , se presentan cuatro posibilidades que se observan a continuación en el cuadro N°1:

Cuadro N°1: Comparación de un carácter de doble estado de dos OTUs  $j$  y  $k$ ,

		OTU k		
		1	0	
OTU j	Presente (1)	1,1 (a)	1,0 (b)	a+b
	Ausente (0)	0,1 (c)	0,0 (d)	c+d
		a+c	b+d	m=a+b+c+d

Donde:

1,1 (a): Ambos OTUs tienen el carácter comparado

1,0 (b): El carácter está presente en el primer OTU y ausente en el segundo.

0,1 (c): El carácter está ausente en el primer OTU y presente en el segundo.

0,0 (d): Ambos OTUs presentan ausencia del carácter comparado.

El coeficiente varía de 0 a 1, siendo el valor 1 el que expresa la máxima semejanza entre dos OTUs.

### 2.2.16. Elección del coeficiente de similitud

Sevilla y Holle (2004) señalan que, la elección del coeficiente de similitud dependerá del tipo de datos que constituyan la matriz básica MBD. Generalmente los coeficientes de distancia y los coeficientes de correlación se usan para los datos multiestado y los coeficientes de asociación y de distancia se utilizan para los datos doble estado. Entre los coeficientes de asociación se encuentran: Coeficiente de Roger y Tanimoto, Sokal y Sneath, Hamann, Yule, Coeficiente ( $\phi$ ) de Pearson, Russel y Rao, Kulczynski, Ochiai. Los coeficientes de similitud más utilizados para datos binarios tenemos: el Coeficiente de similitud de Dice y Sorensen; el Coeficiente de similitud de Jaccard (J) y el coeficiente de similitud de Sokal y Michener o Coeficiente de Concordancia simple "Simple Matching" (SM).

Cuadro N°2: Formula de Coeficiente de similitud de Dice y Sorensen

$$S_D = \frac{2a}{2a + b + c} = \frac{a}{\frac{(a + b) + (a + c)}{2}}$$

Da mayor importancia a las dobles presencias. Es la proporción de caracteres copresentes respecto al promedio de los caracteres presentes en cada OTU

Cuadro N°3: Coeficiente de similitud de Jaccard (Sneath)

$$S_J = \frac{a}{a + b + c}$$

No considera las dobles ausencias. Es la proporción de caracteres presentes que comparten, respecto al total de caracteres presentes en las 2 OTUs. Puede usarse con datos de marcadores dominantes (RAPD y AFLP), por cuanto las ausencias podrían corresponder a recesivos homocigóticos.

Cuadro N°4: Coeficiente de similitud de Simple Matching:

$$S_{SM} = \frac{a + d}{a + b + c + d}$$

Simplemente es la proporción de caracteres que comparten las dos muestras.

**Winzer et al., (2004)** mencionan que, para considerar algunos criterios en la elección de los coeficientes de similitud se tiene que tener en cuenta la concepción del mismo. Jaccard reporta que dos muestras son más parecidas cuantos más «unos» compartan la coincidencia de «ceros» no aporta a la similitud, es decir no considera dobles ausencias para no sobreestimar la similitud a partir de características que no está presentes en ninguno de los dos individuos. Mientras que para Sokal y Michener, dos muestras deberán considerarse más asociadas tanto cuando comparten «unos» como «ceros», ya que la codificación que se les asigna es indistinta

### 2.2.17. Matriz de similitud

**Crisci y Lopez (1983)** reportan que, con los valores de similitud obtenidos de cualquiera de los coeficientes de similitud para los pares posibles de OTU ordenados en forma tabular constituyen la matriz de similitud; La cual es de tipo diagonal y recoge el valor de similitud entre OTU. En ocasiones en vez de matrices de similitud se calculan matrices de distancia entre todos los pares posibles de OTU.

### 2.2.18. Análisis de agrupamientos

**Rolfh (2000)** reporta que, el análisis de agrupamientos comprende técnicas que siguiendo reglas más o menos arbitrarias, forman grupos de OTU que se asocian por su grado de similitud. Las más utilizadas son las del siguiente tipo: Exclusivas, jerárquicas, aglomerativas y secuenciales (SAHN: *Sequential, Agglomerative, Hierchical and Nested*). El significado de cada uno de los términos es el siguiente:

- Técnicas exclusivas: Originan grupos donde las OTU son exclusivas del grupo del cual forman parte y no pueden pertenecer a otro grupo que se halle en un mismo rango o nivel.
- Técnicas jerárquicas: Originan conjuntos que presentan rangos, en los cuales las OTU o grupos de OTU subsidiarios forman parte de un grupo mayor o inclusivo.
- Técnicas aglomerativas: Son las que partiendo en OTU separadas, las agrupa en sucesivos conjuntos para llegar finalmente a un solo conjunto que contiene a las unidades
- Técnicas secuenciales: Se forma un grupo de cada vez, hasta que se agota el conjunto total

El procedimiento a seguir en un análisis de agrupamientos es el siguiente:

1. Examen de la matriz de similitud para localizar el valor de similitud más alto, lo que conduce a la formación del primer núcleo (conjunto formado por dos OTUs)
2. Se busca el próximo valor de mayor similitud, lo que puede suponer:
  - Formación de nuevos núcleos
  - Incorporación de una nueva OTU a un núcleo, con lo que se originaría un grupo (conjunto formado por más de dos OTU)
  - Fusión de núcleos existentes.

3. Se repite la segunda etapa hasta agotar todas las OTU. El resultado final es la obtención de un dendograma.

Existen métodos para el cálculo de la similitud entre la OTU candidato a incorporarse y el grupo o núcleo al que se incorpora. El más utilizado es el UPGMA (*Unweighed Pair-Group Method Usin Arithmetic Averages*) "Media aritmética no ponderada".

Según este método las OTU se incorporan a grupos o núcleos ya formados, teniendo en cuenta que el valor de similitud entre las OTU candidato a incorporarse y el grupo o núcleo es igual a una similitud promedio resultante de los valores de similitud entre el candidato y cada uno de los integrantes del grupo o núcleo. Si el candidato a incorporarse es un grupo o núcleo, el valor de similitud será el promedio de los valores de similitud entre los pares posibles de OTU provenientes una de cada grupo o núcleo.

#### **2.2.19. Representación gráfica del análisis de agrupamiento**

**Rolfh (2000)** reporta que, la estructura taxonómica obtenida de la matriz de similitud con las técnicas de análisis de agrupamiento puede representarse gráficamente utilizando un dendograma, el cual es un diagrama arborescente que muestra la relación del grado de similitud entre dos OTUs o grupos de OTUs. El dendograma (fenograma) es un diagrama arborescente que muestra la relación en grado de similitud entre dos OTUs o grupo de OTUs. Los valores de similitud se expresan en una escala que suele encontrarse en su extremo superior. Los dendogramas son modo alternos de mostrar una multibifurcación como una serie de bifurcaciones en el mismo nivel.

Básicamente un dendograma incluye a dos tipos de gráficos: fenogramas y cladogramas, el primero representa relaciones fenéticas, en cambio, en el segundo las ramificaciones están basadas en las conexiones filogenéticos entre las OTUs.

### 2.3. Hipótesis

**Ho:** Existe diversidad genética en las 50 accesiones de habas (*Vicia faba* L.) mediante el uso de marcadores moleculares AFLP.

**Ha:** No existe diversidad genética en las 50 accesiones de habas (*Vicia faba* L.) mediante el uso de marcadores moleculares AFLP.

### 2.4. Identificación de Variables

Variable Independiente : Accesiones de haba

Variable Dependiente : Similitud genética  
: Grado de Polimorfismo



## **CAPITULO III: Metodología de la Investigación**

### **3.1. Ámbito de estudio:**

La siembra de las accesiones de haba se realizó en la Estación Experimental "Común Era" de la EAP de Agronomía (EAPA), de la Universidad Nacional de Huancavelica (UNH), durante la Campaña Agrícola de secano 2010 a 2011. La caracterización molecular se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) utilizando la técnica de Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP).

#### **3.1.1. Ubicación política**

Región	: Huancavelica
Provincia	: Acobamba
Distrito	: Acobamba
Lugar	: Ciudad Universitaria Común - Era

#### **3.1.2. Ubicación geográfica**

Altitud	: 3410 msnm.
Longitud oeste	: 74° 34' 10" del Meridiano de Greenwich
Latitud sur	: 12° 48' 10"
Distancia	: 1.2 Km. de Acobamba

#### **3.1.3. Factores climáticos**

Precipitación pluvial	: 700 mm. Promedio Anual
T° Promedio	: 12° C.
Humedad relativa	: 60 % Promedio Anual.

**3.2. Tipo de Investigación:** Experimental

**3.3. Nivel de Investigación:** Básico

**3.4. Método de Investigación:** Se realizó el método Hipotético-Deductivo con las siguientes etapas:

**3.4.1. Material Vegetal**

El material que se utilizó para la caracterización molecular, forma parte de la colección de haba del Programa de Mejoramiento Genético de la Escuela Académica Profesional de Agronomía, de la Universidad Nacional de Huancavelica. Las poblaciones que se evaluaron correspondieron a 50 genotipos que fueron seleccionados por sus buenas características agronómicas, este material vegetal se detalla en la tabla N°1. Luego, el material colectado fue llevado al laboratorio (IBT), para conservarlo a bajas temperaturas hasta la extracción del ADN.

Tabla N°1: Material vegetal de haba

Origen: Perú – Procedencia: Huancavelica			
Código	Accesión	Código	Accesión
EAPA 01	Usguusgu	EAPA 14	Blanca checccche
EAPA 02	Verde moro	EAPA 15	Loro moro
EAPA 03	Pucapacra	EAPA 16	Verde lochuq quieto
EAPA 04	Verde yuracc	EAPA 17	Osqo verde
EAPA 05	Yuracc moro	EAPA 18	Quiyupucu
EAPA 06	Pucaoxo	EAPA 19	Verde jillgay
EAPA 07	Quilla uspac	EAPA 20	Oxoinchi
EAPA 08	Chiuchi puca	EAPA 21	Ccellccayyuracc neto
EAPA 09	Uchuy puco chico	EAPA 22	Pacrajillgay
EAPA 10	Guinda yarita blanca	EAPA 23	Yanayuracc
EAPA 11	Pacrajellquecc	EAPA 24	Oxo mediano
EAPA 12	Verde mani	EAPA 25	Cruzado qerjay
EAPA 13	Puca puerto	EAPA 26	Rosado enchik

Origen: Perú – Procedencia: Huancavelica			
Código	Accesión	Código	Accesión
EAPA 27	Señorita blanca	EAPA 39	Manijillayana
EAPA 28	Ñutuusqu	EAPA 40	Uchuyutupicsa
EAPA 29	Collgay verde	EAPA 41	Orasancclccay
EAPA 30	Pucajuito	EAPA 42	Yanayuraq señorita
EAPA 31	Oqsopacra	EAPA 43	Pacaysito lindo
EAPA 32	Verde yana	EAPA 44	Puitopacra
EAPA 33	Puco pacay	EAPA 45	Ocho chipo yuraq
EAPA 34	Yana ñuto	EAPA 46	Gillo moro
EAPA 35	Moradito blando	EAPA 47	Jergón
EAPA 36	Checchesito	EAPA 48	Yanagillo
EAPA 37	Blanco mejorado	EAPA 49	Mancha quillo
EAPA 38	Uchuyyanainchi	EAPA 50	Verde lachoq

### 3.4.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de los folíolos tiernos y frescos, este procedimiento de extracción del ADN se realizó mediante un protocolo de extracción establecido por **Doyle y Doyle (1990)**, con algunas modificaciones, resumidas en el Anexo N°1. Este protocolo fue estandarizado en el laboratorio de Biología Molecular del IBT y utilizado en estudios previos con buenos resultados. Para cada muestra se realizó lo siguiente:

1. Se utilizó el material vegetal a bajas temperaturas. Se cogió hojas tiernas de haba y se cortó en pedazos con un bisturí estéril, quitándole las nervaduras.
2. Luego en un mortero frío se trituraron aproximadamente 100 mg de hoja previamente enfriado con nitrógeno líquido, hasta obtener el material vegetal pulverizado.
3. El material vegetal pulverizado se transfiere en un tubo eppendorf de 1,5 ml hasta la marca de 500  $\mu$ l, para luego añadirle 700  $\mu$ l de buffer CTAB (2X), cuya composición se detalla en la tabla N°2, adicionando 2  $\mu$ l de  $\beta$  mercaptoetanol. Agitar suavemente e incubar por 30 minutos a 65 °C, en baño maría.

4. Después de la incubación, los tubos se dejarón reposar por espacio de 2 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó 700 µl cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) para luego mezclarlos suavemente. Esta mezcla fue centrifugada por 10 min a 14 000 rpm.
5. Seguidamente el sobrenadante resultante de la centrifugación fue transferido a un nuevo tubo Eppendorf. El contenido del tubo se mezcló por inversión.
6. Al sobrenadante obtenido se le adicionó 50 µl de CTAB (10X), cuya composición se detalla en la tabla N°3 el cual se mezcló suavemente para homogenizar todo el líquido, para luego adicionarle 700 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclarlo suavemente y nuevamente centrifugarlo por 10 min a 14 000 rpm.
7. Seguidamente, el sobrenadante resultante de la centrifugación fue transferido a un nuevo tubo Eppendorf. El contenido del tubo se mezcló por inversión.
8. Luego, al nuevo tubo se añadió (500 µl aprox.) de Isopropanol helado para precipitar el ADN, para esto se mezcló suavemente hasta ver la medusa de ADN. Incubar a -20 °C durante 40 min.
9. Esta mezcla fue llevada a una temperatura de -20 °C por unos 30 minutos y luego se centrifugó el contenido del tubo a 14000 rpm por 20 minutos.
10. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante cuidando de no perder el pellet y dejando secar el tubo.
11. El pellet fue lavado dos veces con 500 µl de etanol al 70 por ciento y centrifugado a 14000 rpm por 15 minutos. El etanol del lavado fue descartado y se agregó nuevamente al tubo 500 µl de etanol al 90 por ciento y centrifugado a 14000 rpm por 15 minutos. El etanol del lavado fue descartado.

12. Se dejó que el ADN (pellet) seque a temperatura ambiente durante 1 hora, invirtiendo el tubo.

13. Finalmente se resuspendió el ADN (pellet), y se le agregó 80  $\mu$ l de buffer T10E1 ó agua MiliQ estéril y se almacenó a -20 °C.

Tabla N°2: Composición del CTAB 2x

Componentes	Para 1000 ml
Tris 1molar Ph 8:00	100ml
Nacl	81.81gr
EDTA	40ml
Ctab	20gr
PVP (polivinilpirrolidone)	10gr
H2O destilada	1lt

Tabla N° 3: Composición del CTAB 10x

Buffer de extracción (CTAB 10X)		
Reactivo	[CC. final]	100 ml
CTAB	10%	10 g
NaCl 5M	0,7 M	14 ml
0,5M EDTA (pH 8,0)	20 mM	4 ml
1M Tris:HCl (pH 8,0)	100 mM	10 ml
Agua destilada H <sub>2</sub> Odd		72 ml

Nota el Ctab y el PVP se agregan al final y en caliente luego se autoclava

### 3.4.3. Cuantificación y calidad del ADN

Después de la extracción del ADN, se procedió a la cuantificación y estimación de su pureza en cada muestra, utilizando un transiluminador UV/TS Imaging System With 230V-50H2.

Para medir su concentración se utilizó una técnica bastante sencilla la cual consistió en el análisis comparativo de muestras coloreadas con bromuro de etidio en geles de agarosa. La técnica consistió en la utilización del cálculo de las bandas bajo luz ultravioleta según la fluorescencia. Esta variación es la más adecuada para la cuantificación, pues ocurre la separación del ADN y del ARN durante la electroforesis y se reduce la imprecisión del proceso de cuantificación cuando el ácido nucleico analizado presenta contaminantes que se unen al bromuro de etidio.

Para verificar la calidad de ADN, se preparó un gel de agarosa al 1% la preparación del gel esta detallada en el Anexo N°2, con 2ul de bromuro de etidio disuelta en TBE cuya composición se detalla en la tabla N°4, en una cámara de electroforesis horizontal de (12x 24 modelo sunrise de lifetecnologies). En cada pozo se depositó 1ul de la dilución de ADN y 9ul de colorante de carga (Blue Juice) su composición se detalla en la tabla N°5 previamente homogenizados en una placa, al centro de las muestras se colocaron 9ul del marcador de peso molecular DNA lambda ( $\lambda$ ) digerido con PstI, el cual se encontraba a una concentración de 280ng/ul, cuya banda de más alto peso molecular es de 14800 pb. La electroforesis se realizó a 90v. Finalizando la corrida de las muestras, se observó la calidad del ADN y también se visualizó el ARN (figura N°1) en un equipo transiluminador con cámara de video digital (UV/ TS imaging system), con luz ultravioleta conectada a un ordenador, lográndose tomar las imágenes necesarias para el análisis. Seguidamente a las muestras se le agregó 1ul de RNAsa por 1 hora a 37°C. La preparación de las muestras para las mediciones se detalla en el Anexo N°3.

El cálculo aproximado de la concentración de ADN en las soluciones probadas, se realizó mediante la observación de la fotografía del gel en presencia de luz ultravioleta o de la imagen digitalizada del propio gel. Luego de este procedimiento se prepararon diluciones de las muestras de ADN a

una concentración de 5 ng/μl necesaria para luego hacer la amplificación en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando marcadores AFLP.

Tabla N° 4: Componentes del Buffer TBE 10 X

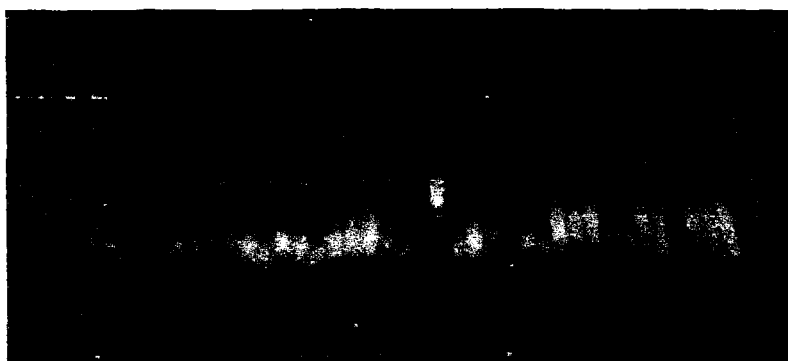
Componentes	Para 1 Litro
Tris Base	108 g
Acido Bórico	55 g
EDTA 0,5M pH 8,0	40 ml

Ajustar el pH hasta 8,0 con ácido acético glacial ó HCl

Tabla N°5: composición de Blue Juice

Tampón de carga (Blue Juice)			
Reactivo	Stock	[CC. final]	100 ml
Glicerol	100%	70%	70
NEB	10X	0,5X	5
EDTA	0,25 M	20 mM	10
SDS	20%	0.2%	1
Azul de Bromofenol		0.25%	0,25 g
Agua destilada H <sub>2</sub> Odd			hasta 100 ml

Figura N°1: gel de agarosa al 1% observando el ADN y ARN



### 3.4.4. Desarrollo de la técnica de AFLP

La técnica usada para detectar los marcadores AFLP se realizó según el método desarrollado por Vos *et al.*, (1995), con ligeras modificaciones para ADN genómico de plantas del manual Protocolos de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT), el procedimiento fue el siguiente:

#### a) Digestión del ADN genómico.

Para este paso la calidad de ADN fue un factor determinante, debiendo ser este de buena calidad, no degradado, sin contaminantes, ni inhibidores, para el uso de la técnica de AFLP.

Para la digestión se preparó la mezcla de los componentes (tabla N° 6), esta mezcla fue centrifugada durante algunos segundos para facilitar que los componentes se mezclen completamente.

Tabla N°6: Reacción de digestión de ADN genómico

Reactivo	[CC. inicial]	[CC. final]	Cantidad por Rx (μl)
Agua destilada (H <sub>2</sub> Odd)			2,45
Buffer 10X # 2 NEB			1,0
Albúmina de suero (BSA) 10X			1,0
Eco RI NEB	20 U/μl	20 U	0,5
Mse I NEB	5 U/μl	5 U	0,05
			5
DNA genómico	500 ng/μl		5
Volumen Total			10

Posteriormente la reacción se incubó a 37°C por 12 horas para inactivar las endonucleasas de restricción, las muestras se incubaron a 65°C por 15



minutos obteniéndose el ADN digerido, y con el fin de detener la reacción las muestras fueron colocadas en frío (-20°C).

### b) Ligación de Adaptadores

En este procedimiento se ligaron los adaptadores a los sitios cohesivos resultado de la digestión del ADN, con las enzimas de restricción a fin de generar secuencias conocidas para la amplificación; para lo cual se preparó una solución descrita en la Tabla N°7, agregando 3ul del ADN digerido, luego la solución del ADN digerido y ligado se incubó a temperatura ambiente (20°C) durante 16 horas y almacenándose a -20°C, posteriormente en una placa se agregó 20 µl de solución buffer T<sub>10</sub>E<sub>0.1</sub> y se adicionó 5 µl del ADN digerido y ligado de las 50 muestras, para luego ser almacenado a -20°C hasta la pre-amplificación.

Tabla N°7: Ligación de Adaptadores

MMx	Cantidad por Rx (µl)
Agua destilada (H <sub>2</sub> Odd)	0,2
Buffer 10X T4 DNA Ligasa	1,25
Msel adaptador 100 µM	0,5
EcoRI adaptador 10 µM	0,5
T4 DNA Ligasa NEB (400 U/µl)	0,05
Volumen Total	2.45

### c) Reacción de Pre-Amplificación (+1/+1)

Para este procedimiento se preparó una solución de master mix (MMx) en tubos eppendorf de 0.5 ml, con los componentes mencionados en la Tabla N°8, conservando cada componente sobre hielo para mantener la estabilidad de los mismos. En una placa de policarbonato PCR de 96 pocillos se agregó

20ul del (MMx) preparado adicionándole 5ul de ADN digerido y ligado para las 50 muestras, previamente homogenizada esta reacción de pre-amplificación de PCR se llevo al termociclador (Gene Amp PCR System 9700), el cual se programó con las condiciones de temperatura y tiempo que se muestra en la tabla N°9.

Tabla 8: Reacción de Pre-Amplificación (+1/+1)

PRE – AMPLIFICACIÓN	
MMX	Cantidad por Rx (μl)
Agua destilada (H <sub>2</sub> Odd)	11,55
Buffer 10X	2,5
MgCl	2,5
d NTPs (5 mM)	1,25
Primer Eco + A (50 ng/μl)	1,00
Primer Mse + A (50 ng/ μl)	1,00
Taq "R"	0,2
Volumen Total	20
ADN D/L (1:5)	5
Volumen Total	25

Tabla N°9: Reacción de pre- amplificación de PCR

PROGRAMA DE PRE-AMPLIFICACIÓN			
T (°C)	Tiempo		Ciclos
72	2	min.	1
94	30	Seg.	24
56	60	Seg.	
72	60	Seg.	
4	∞	Seg.	Fin de programa

**d) Amplificación Selectiva (+3/+3)**

Para este procedimiento se utilizaron 23 combinaciones de primers específicos, conteniendo 3 nucleótidos adicionales en sus extremos, a fin de amplificar un número menos y específico de los fragmentos del ADN; preparándose una solución de master mix (MMx) con los componentes que se observa en la tabla N°10.

En una placa de policarbonato PCR de 96 pocillos, se agregó 8ul de la solución de amplificación selectiva, añadiéndole 2ul de la pre- amplificación para las 50 muestras y luego llevarlas al termociclador (Gene Amp PCR System 9700), programándose la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con las condiciones de temperatura y tiempo que se muestra en la tabla N°11.

Tabla N°10: Amplificación Selectiva (+3/+3)

AMPLIFICACION SELECTIVA	
MMX	1 Reacción (ul)
Agua destilada (H <sub>2</sub> Odd)	2,8
Buffer 10X	1.10
MgCl	1,0
d NTPs	0.6
Eco + 3	2.00
Mse + 3	0.30
Taq "R"	0.2
Volumen total	8
ADN Pre-Amplificado.	2.0
Volumen total	10.3 ul

Tabla N°11: Programa de amplificación selectiva –AFLP

N°	T (°C)	Tiempo	Ciclos
1	94	4 min	1
2	94	20seg	
3	65	30seg	1
4	72	2min	
5	94	20seg	
6	65	30seg bajando 1°C por ciclo	
7	72	2min	
8	Repetir desde el paso 5 al 7		10
9	94	20seg	
10	56	30seg	
11	72	2min	
12	Repetir desde el paso 9 al 11		20
13	60	30min	
14	10	Fin del programa	

### 3.4.5. Selección de combinaciones de iniciadores

Se realizó un ensayo (screening) con 23 combinaciones de primers, utilizando las 50 muestras de amplificación selectiva; eligiéndose 7 combinaciones de primers, por presentar buena resolución de bandas, buen nivel de polimorfismo y reproducibilidad. La secuencia de los iniciadores se detalla en la tabla N° 12.

Tabla N°12: Secuencia de iniciadores

Cebadores	Secuencia 5' - 3'
E32 M45	<i>EcoRI</i> -AAC / <i>MseI</i> -ATG
E13 M59	<i>EcoRI</i> -GAT / <i>MseI</i> - ATT
E32 M59	<i>EcoRI</i> -AAC / <i>MseI</i> -ATT
E38 M59	<i>EcoRI</i> -ACT- / <i>MseI</i> -ATT
E12 M41	<i>EcoRI</i> -CAA / <i>MseI</i> -AGG
E12 M35	<i>EcoRI</i> -CAA / <i>MseI</i> -ACA
E13 M35	<i>EcoRI</i> -GAT / <i>MseI</i> -ACA

### 3.4.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para este procedimiento se tuvo que limpiar con alcohol de 96° dos vidrios diferentes, uno de los vidrios recubierto con adherente y el otro vidrio recubierto con repelente, luego se ensambló ambos vidrios y se vertió la preparación de poliacrilamida al 6% con persulfato y temed, la combinación de estos compuestos se detalla en el Anexo N°4; seguidamente se colocó un peine que formó los pozos donde se añadió el ADN amplificado, dejando que polimerize para tener listo el gel de poliacrilamida para luego llevarlo al equipo electroforético (Modelo 192 BioRad sub-cellPower PAC 3000) para realizar un pre-corrido por 15 minutos a 1600 voltios, luego se colocó en los pozos formados del gel de poliacrilamida al 6% el ADN amplificado, que previamente fue desnaturalizado a 72°C por 5 minutos, terminado se conectó a un ordenador con un voltaje de 1500 por 3 horas hasta que el ADN migró a una cierta altura.

### 3.4.7. Tinción y revelado de geles de poliacrilamida

El procedimiento empleado para la visualización de los fragmentos amplificados fue con la técnica de tinción en nitrato de plata, usando los procedimientos descritos por technical manual promega (1999) como sigue:

Al finalizar la electroforesis se retiró el vidrio ensamblado, luego el vidrio con el gel adherido fue separado del vidrio con repelente y se colocó en una solución de ácido acético al 10% con los componentes de la tabla N°13, durante 20 minutos en agitación para la fijación del ADN, luego se retiró el exceso de ácido acético para después colocar en una solución que contiene nitrato de plata con los componentes que se describen en la tabla N°14, por 20 minutos en agitación. Posteriormente se colocó en una solución que se describe en la tabla N°15 para el revelado de los productos de la reacción en cadena de la polimeraza en un tiempo de 15 minutos hasta que se visualice las bandas; para detener la reacción de la solución reveladora del gel este se colocó en una solución de ácido acético al 10% durante 10 minutos y finalmente se enjuagó con agua destilada, para dejar secar.

TABLA N°13: Fijación del gel

SOLUCION DE FIJACION	
Etanol al 10% con 0.5 ml / 100 ml de Ácido Acético.	
Reactivo (Solución cc.)	1 L (ml)
Etanol	100
Ácido Acético glacial	5
Agua destilada	900

Tabla N°14: Tinción del gel

SOLUCION DE TINCION	
Nitrato de Plata al 2%	
Reactivo (Solución cc.)	1 L
AgNO <sub>3</sub> (PM=169.9)	2 g
Agua destilada (H <sub>2</sub> Odd)	1000 ml

El nitrato de plata es un agente corrosivo oxidante

Tabla N°15: Revelado del gel

SOLUCION DE REVELADO	
Hidróxido de Sodio al 3% + 0.5ml / 100ml Formaldehído	
Reactivo (Solución cc.)	1 L
NaOH	30 g
Formaldehído al 36 - 38%	5 ml
Agua destilada	800 ml

El formaldehído es cancerígeno; además causa lagrimeo y es inflamable.

### 3.4.8. Escaneado y lectura (scoreo) de bandas

Se leyeron las bandas con mejor resolución y se enumeraron consecutivamente empezando desde la primera muestra del primer carril hasta la última muestra haciendo un total de 50 muestras analizadas.

### 3.5. Diseño de Investigación:

Se elaboro una matriz de ceros (ausencia) y unos (presencia) para generar una matriz de coeficiente de similitud usando el coeficiente de similaridad Simple Matching (SM) y determinar la similitud genética entre las accesiones. La matriz se utilizo para construir un dendrograma con el algoritmo UPGMA (Un-weighted Pair-Grouping Methodusing Arithmetic Averages) (**Hair et al., 1992**)

A continuación se detalla la fórmula del Coeficiente de Similitud SM:

$$S_{ij} = \frac{a+d}{a+b+c+d}$$

$S_{ij}$  = Similitud entre los individuos i y j

a = Numero de pares (1,1)

b = Numero de pares (1,0)

c = Numero de pares (0,1)

d = Numero de pares (0,0)

### 3.6. Población, Muestra, Muestreo

**3.6.1. Población:** El banco de germoplasma de la EAP- Agronomía de la Universidad Nacional de Huancavelica, tiene un total de 120 accesiones de haba (**Vicia faba L.**) procedentes de la cuenca del Mantaro (desde el Valle del Mantaro hasta el Valle de Huanta).

**3.6.2. Muestra:** Se utilizó 50 accesiones o genotipos seleccionados aleatoriamente.

**3.6.3. Muestreo:** Las 50 accesiones que se utilizó en el estudio fueron seleccionadas por muestreo aleatorio simple.

### 3.7. Técnicas e Instrumentos de Recolección de datos

Para la extracción del ADN se realizó mediante un protocolo de extracción establecido por **Doyle y Doyle (1990)**, se utilizaron folíolos del tercio superior; para la cuantificación y calidad de ADN se usó una técnica que consistió en el análisis comparativo de muestras coloreadas con bromuro de etidio en geles de agarosa en presencia de luz ultravioleta. Para el genotipado de las poblaciones se utilizó la técnica de polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN de la planta que se estudia es previamente digerido por la acción de dos enzimas de restricción. Esto produce miles de cortos fragmentos de DNA. Posteriormente, los extremos de estos fragmentos son ligados a unas secuencias de nucleótidos denominadas adaptadores, empleando principios basados en el protocolo descrito por **Vos et al., (1995)** y un protocolo estandarizado en el laboratorio de Biología Molecular del IBT.

Para la detección y evaluación de bandas se utilizó la técnica de electroforesis que se basa en la separación de moléculas en un campo eléctrico, de acuerdo con el tamaño y la carga que poseen. Para evaluar y analizar las bandas de ADN se utilizó la técnica de tinción en nitrato de plata, visualizándose bandas polimórficas.

### 3.8. Procedimiento de Recolección de Datos

**3.8.1. Registro de datos:** La evaluación de polimorfismo fue registrada directamente a partir de los vidrios teñidos y revelados, utilizando para ello un transiluminador de luz blanca. Para cada una de las combinaciones se realizó una matriz binaria, codificando la presencia y ausencia de bandas como 1 y 0 respectivamente. Con los datos compilados se construyó una matriz básica de datos de 50 entradas por 139 marcadores (Anexo N°5).

**3.8.2. Obtención de la matriz de similitud:** Para generar la matriz de similitud, se utilizó la matriz básica de datos (ver Anexo N°6), usando coeficiente de similitud "simple matching coeficiente (SMC), el cual da igual peso a (0,0) y (1,1). Para este análisis se utilizó el programa de NTSYS versión 2.2.



**3.8.3. Conformación de grupos:** Para el análisis de agrupamiento, se uso el programa SAHN-Clustering incluido en el NTSYS, basado en el método de ligamiento UPGMA; con ello se generó un dendograma que permite visualizar las distancias genéticas de acuerdo al coeficiente de similitud, previamente calculadas para las entradas analizadas.

### **3.9. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos**

#### **3.9.1. Análisis de Agrupamiento**

En base a la matriz de similitud que fue obtenida del análisis de similaridad, se prepararon los dendogramas, que se realizaron según el algoritmo UPGMA (Unweigthed Pair- Group Methodusing Arithmetic Averages), y nos permitió visualizar las distancias genéticas de acuerdo al coeficiente de similitud, previamente calculadas para las entradas analizadas. Todo incluido dentro del módulo SAHN del programa NTSYS-pc versión 2.2.

#### **3.9.2. Análisis de similaridad**

Para el análisis de datos se ingresaron éstos a una matriz binomial, la que fue usada para calcular valores de similitud genética entre cada par de genotipos usando el coeficiente de similitud de Simple Matching, incluidos en el paquete estadístico NTSYS pc versión 2.2. Los análisis con los coeficientes de similitud genética fueron corridos usando el módulo SIMQUAL, obteniéndose una matriz de similitud genética para cada coeficiente, la que fue usada para calcular valores de similitud genética entre cada par de genotipos. Esto es el resultado de una serie de comparaciones, cada una de las cuales tienen dos posibles resultados: similaridad o diferencia.

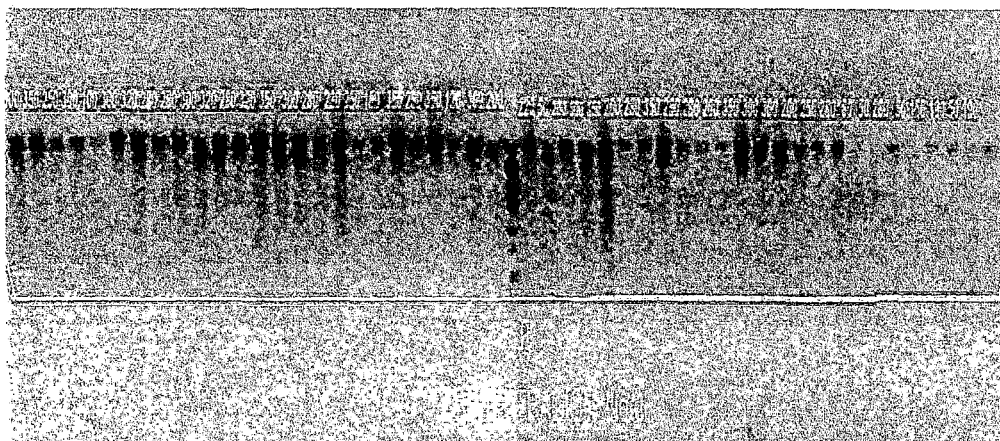
## CAPÍTULO IV: Resultados

### 4.1. Presentación de Resultados

#### a) Extracción, calidad y cuantificación del ADN

La extracción del ADN es un paso fundamental para realizar la técnica del AFLP, es por ello que se realizó dos extracciones de ADN en 50 accesiones de vicia faba L. obteniéndose una calidad de ADN favorable ver la Figura N°2. En cuanto a la cuantificación del ADN se obtuvo concentraciones en un rango que va desde los 350 ng/μl hasta los 50 ng/μl.

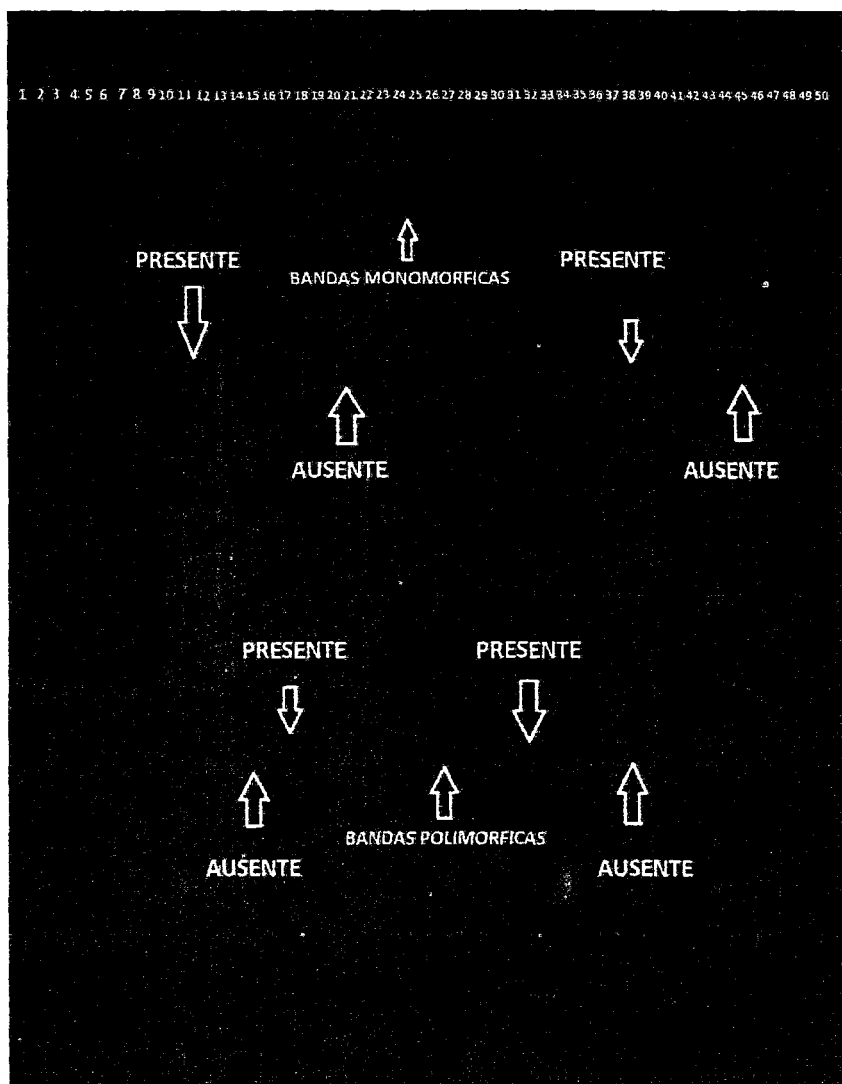
Figura N°2: Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando la concentración y calidad del ADN extraído de las habas.



#### b) Marcadores moleculares AFLP

Empleando las siete combinaciones de primers (Ver tabla N°7), generaron un total de 431 bandas amplificadas donde 292 bandas fueron monomórficas representando un 67.74% y 139 bandas fueron polimórficas, representando un 32.25%. (Ver figura N°3).

Figura N°3: Combinación E38-M59 e identificación de bandas monomórficas y polimórficas en gel de poliacrilamida.



La combinación E12-M35 es la que generó una mayor cantidad de bandas amplificadas en comparación a la combinación E38-M59 que generó la menor cantidad de bandas amplificadas. Sin embargo esta combinación de E38-M59 fue la que generó el mayor porcentaje de polimorfismo mientras que la combinación E32-M35 generó un menor porcentaje de polimorfismo. Sin embargo la combinación E38-M59 es el mejor por generar el mayor porcentaje de polimorfismo con un 46.93%. En base a estos resultados se encontró variabilidad entre las 50 accesiones de haba, lo cual se vio reflejado en el polimorfismo detectado con marcadores AFLP.

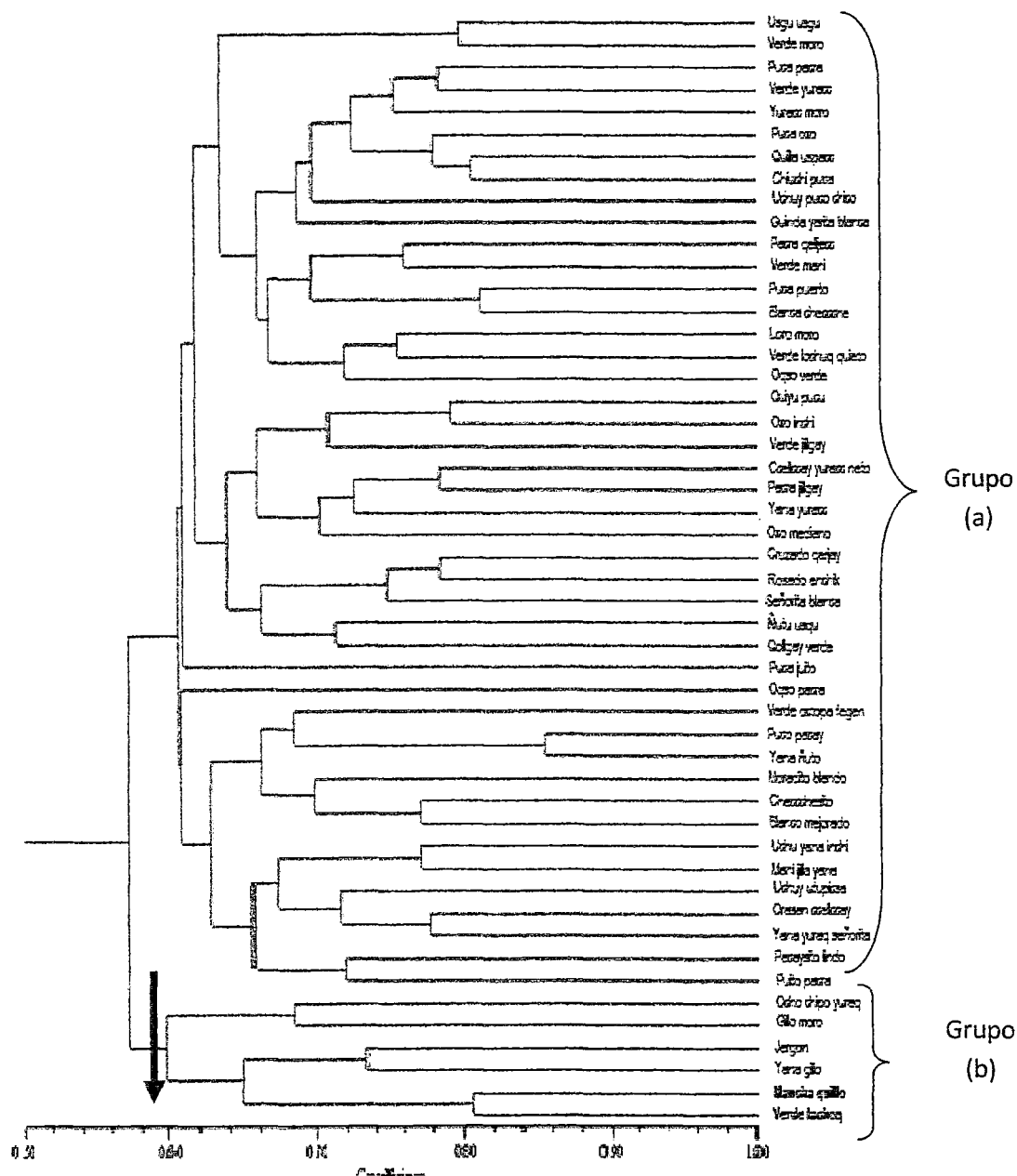
Tabla N°16: Total de combinaciones de primers y el polimorfismo generado.

Combinación	Número total de bandas	Bandas monomórficas	Bandas polimórficas	Porcentaje de polimorfismo
E32 M35	63	49	14	22.22
E13 M59	58	36	22	37.93
E32 M59	62	42	20	32.25
E38 M59	49	26	23	46.93
E12 M41	54	34	20	37.03
E12 M35	83	62	21	25.30
E13 M35	62	43	19	30.64
Total	431	292	139	32.25

### c) Análisis de diversidad genética:

En la figura N°4 se muestra el dendograma obtenido del análisis de las 50 accesiones de haba donde: en un coeficiente de similitud de 0,59, se formaron dos grupos; el primer grupo (a) es un gran grupo constituido por 44 accesiones (Usguusgu, Verde moro, Pucapacra, Verde yuracc, Yuracc moro, Pucaoxo, Quilla uspac, Chiuchi puca, Uchuy puco chico, Guinda yarita blanca, Pacrajellquecc, Verde mani, Puca puerto, Blanca checccche, Loro moro, Verde lochuq quieto, Osqo verde, Quiyupucu, Verde jillgay, Oxoinchi, Ccellccayyuracc neto, Pacrajillgay, Yanayuracc, Oxo mediano, Cruzado qerjay, Rosado enchik, Señorita blanca, Ñutuusqu, Collgay verde, Pucajuito, Oqsopacra, Verde yana, Puco pacay, Yana ñuto, Moradito blando, Checcchesito, Blanco mejorado, Uchuyyanainchi, Manijillayana, Uchuyutupicsa, Orasancellccay, Yanayuraq señorita, Pacaysito lindo, Puitopacra) y el segundo grupo (b) está conformado por 6 accesiones (Ocho chipo yuraq, Gillo moro, Jergón, Yanagillo, Mancha quillo, Verde lachoq).

Figura N°4: Dendograma que agrupa 50 accesiones de haba con 7 marcadores de AFLP a un coeficiente de 0,59



En la figura N°5, se observa que a un coeficiente de similitud de 0,62 se llegan a formar 7 grupos, el primer grupo (a) formado por 17 accesiones (Usguusgu, Verde moro, Pucapacra, Verde yuracc, Yuracc moro, Pucaoxo, Quilla uspac, Chiuchi puca, Uchuy puco chico, Guinda yarita blanca, Pacrajellquecc, Verde mani, Puca puerto, Blanca checccche, Loro moro, Verde lochuq quieto, Osqo verde ), el segundo grupo (b) conformado por 12 accesiones (Quiyupucu, Verde jillgay, Oxoinchi, Ccellccayuracc neto, Pacrajillgay, Yanayuracc, Oxo mediano, Cruzado qerjay, Rosado enchik, Señorita blanca, Ñutuusqu, Collgay verde); el tercer grupo (c) por Pucajuito, el cuarto grupo (d) por Oqsopacra, el quinto grupo (e) por 13 accesiones (Verde yana, Puco pacay, Yana ñuto, Moradito blando, Checcchesito, Blanco mejorado, Uchuyyanainchi, Manijillayana, Uchuyutupicsa, Orasancellccay, Yanayuraq señorita, Pacaysito lindo, Puitopacra), el sexto grupo (f) por 2 accesiones (Ocho chipo yuraq, Gillo moro,) y el séptimo grupo (g) está formado por 4 accesiones. (Jergón, Yanagillo, Mancha quillo, Verde lachoq.)

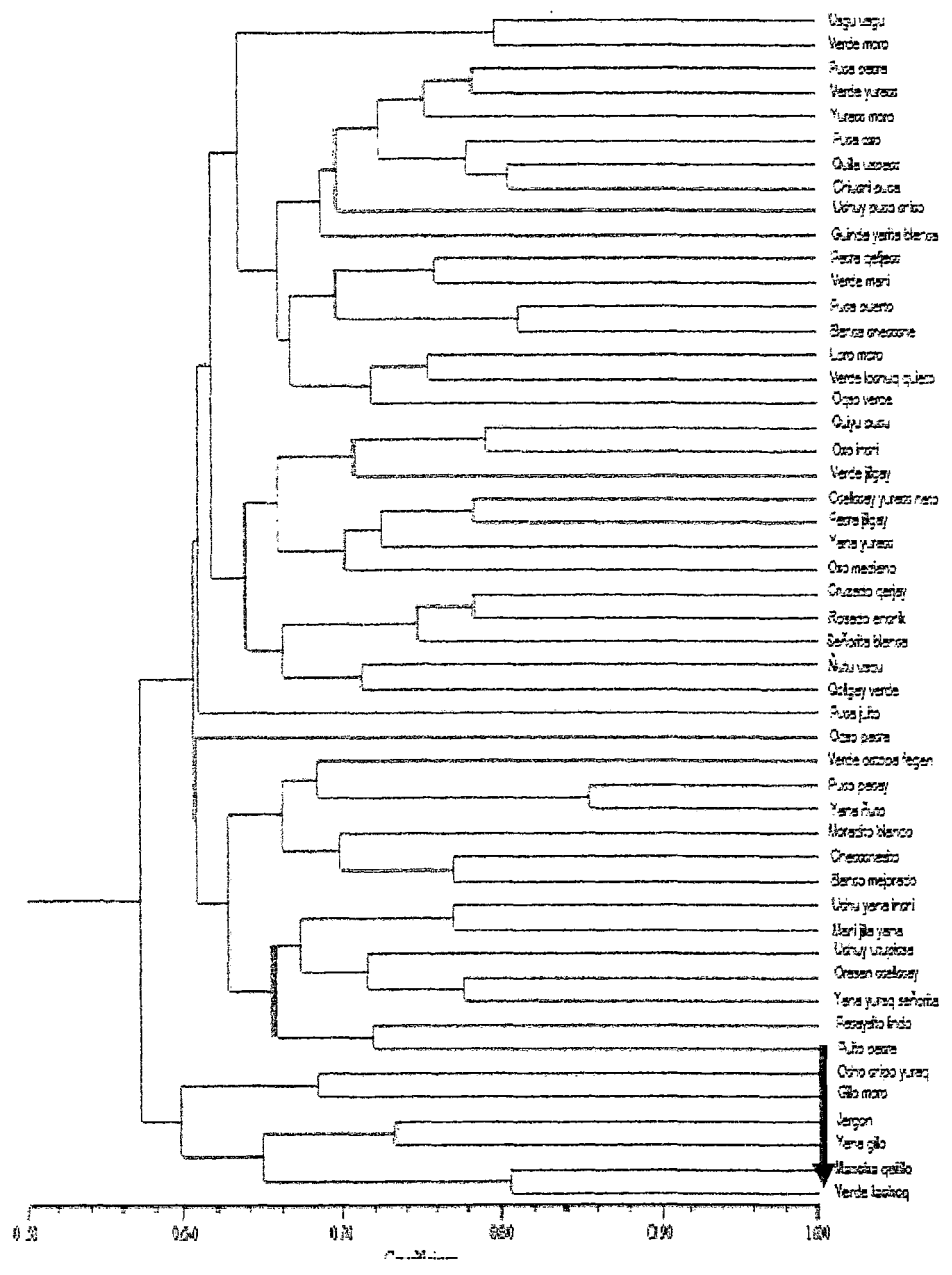
Sin embargo, a un coeficiente de similitud de 1.0, en la figura N°6 todos son diferentes, no hay duplicados en el germoplasma analizado y hay probablemente variabilidad entre los genotipos evaluados. Estos resultados son muy favorables ya que la variabilidad entre las 50 accesiones confiere mayor probabilidad de seleccionar accesiones con buenas características agronómicas y poder encaminar hacia objetivos de mejoramiento genético.

El origen geográfico de las colectas no se asoció con la agrupación del dendograma, este estudio es un primer acercamiento al conocimiento de la diversidad genética entre genotipos cultivados de haba en Huancavelica y se demostró que la técnica AFLP empleada es útil para evaluar la diversidad genética a nivel de variedades. En términos generales con los marcadores AFLP se evidenció una amplia diversidad genética de las habas.

Con estos resultados se observa que hay diversidad genética entre las accesiones de haba, afirmando que es una planta parcialmente alógama, lo cual es favorecido por la polinización cruzada y por lo tanto el flujo de genes entre diferentes genotipos genera



Figura N°6: Dendograma que agrupa 50 accesiones de haba con 7 marcadores de AFLP, a un coeficiente de 1,0.





## 4.2. Discusión

Se evaluaron inicialmente 23 primers en las 50 accesiones de haba de los cuales se utilizaron siete combinaciones de primers por presentar mayor polimorfismo. Del estudio de la combinación de primers E38-M59 presentó el mayor porcentaje de polimorfismo, lo que podría indicar que tiene un alto poder de discriminación; lo cual podría estar indicando el buen desempeño de la técnica con marcadores AFLP pues se encontró variabilidad a nivel molecular entre las 50 accesiones de haba. Ensayos preliminares con la técnica de marcadores AFLP mostraron que es altamente polimórfica y reproducible, confiriendo un alto grado de confiabilidad (Ruiz, 2008). En otras investigaciones utilizando la técnica de marcadores AFLP y el uso de combinaciones de primers en una *Phaseolus vulgaris* L. se evidenció polimorfismo genético (Cruz et al., 2006). Asimismo, en otros estudios en haba mostraron un alto nivel de polimorfismo, argumentando que el polimorfismo genético, puede estar asociado a que es una planta parcialmente alógama, la cual tiende a favorecer la conservación de un alto porcentaje de heterocigotos. (Cruz et al., 2006).

Por otra parte el cultivo de haba se le considera como una planta autógena a esto se le puede atribuir que las 16 combinaciones no utilizadas en la caracterización molecular presentaron un bajo nivel de polimorfismo, lo cual concuerda con otras investigaciones como la ñuña que es una leguminosa y sostienen que por ser autógena presenta bajo nivel de polimorfismo en primers no utilizados (Cruz et al., 2006). En la soya (*Glycine max* L.), en la que se encontró bajo nivel de polimorfismo, indica que tiene una limitada diversidad genética en los cultivos tradicionales, lo cual hace la identificación de marcadores más difícil (Khandka et al., 1996).

De acuerdo al dendograma y la matriz de similitud, hay dos aspectos importantes que destacar: de las 50 accesiones de haba, con un coeficiente de similitud de 0,59 se definieron dos grandes grupos bien diferenciados, esto nos indicó que el primer grupo presenta mayor semejanza entre las 44 accesiones y el segundo grupo conformado por 6 son semejantes entre sí; siendo así que entre el primer grupo y segundo grupo la similitud entre estos dos se alejan. Por otra parte con un coeficiente de similitud de

1.0 no se registraría material duplicado en la colección de habas del banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Huancavelica de la Escuela Académico Profesional de Agronomía, esta variabilidad es de gran importancia debido a que al tener duplicados en los bancos de germoplasma reduce la eficiencia de manejo del banco e incrementa los costos de mantención, regeneración, caracterización y documentación.

La diversidad genética entre las accesiones encontradas indicaría probablemente dos causas, la primera biológica, debido a que el haba es una planta parcialmente alógama esto mostraría que existe un constante intercambio de materiales genéticos y la posible recombinación entre ellos lo que hace probable que existan altos índices de diversidad. Esta tendencia se ha encontrado en estudios realizados por **Jordan (2011)**, que concuerda que en una planta alógama se le atribuye la alta diversidad por el flujo de genes entre los diferentes genotipos, igualmente **Cruz et.al., (2006)**, en su estudio en mora (*rubuss pp.*), argumenta que el polimorfismo genético, puede estar asociado con la naturaleza alógama de la especie, la cual tiende a favorecer la conservación de un alto porcentaje de heterocigotos.

La segunda causa, probablemente vendría a ser la metodológica utilizada por los agricultores y la variabilidad de habas podría ocurrir en el momento de la cosecha como, por ejemplo, cuando se ponen a secar las habas bajo la incidencia de la luz solar y resulta ser más atractivo para los agricultores ver mezcla de habas, por lo tanto ellos se encargan de organizarlas. También puede darse en el momento de la colecta cuando recogen los granos pues hacen este proceso sin una selección determinada o simplemente las mezclas pueden originarse por actividades culturales como juegos, regalos o deudas.

## CONCLUSIONES

1. El uso de marcadores moleculares AFLP permitió detectar diversidad genética de las 50 accesiones de haba (*Vicia faba* L.).
2. Se formaron dos grupos en un coeficiente de similitud de 0.59, el primer grupo constituido por 44 accesiones y el segundo grupo está conformado por 6 accesiones.
3. En un coeficiente de similitud de 0.62 se llegan a formar 7 grupos, el primero está formado por 17 accesiones, el segundo grupo por 12 accesiones, el tercer grupo por 1 accesión, el cuarto grupo por 1 accesión, el quinto grupo por 13 accesiones, el sexto grupo por 2 accesiones y el séptimo grupo está formado por 4 accesiones.
4. A un coeficiente de similitud de 1.0, todos son diferentes, no hay duplicados en el germoplasma analizado y evidencia la variabilidad entre los genotipos evaluados de *Vicia faba* L.

## RECOMENDACIONES

1. En vista de la existencia de variabilidad genética encontrada en los genotipos evaluados (*Vicia faba* L.), se recomienda mantener su identificación y almacenaje cuidadoso, para evitar confusiones en el banco de germoplasma de la EAP-Agronomía.
2. Se recomienda evaluar el total de accesiones de habas (*Vicia faba* L.), del banco de germoplasma de la EAP- Agronomía a fin de completar la información del total de accesiones
3. Confrontar esta variabilidad genética versus la variabilidad morfo agronómica de los estudios realizados anteriormente.
4. En vista de la variabilidad genética encontrada en los genotipos evaluados (*Vicia faba* L.), se recomienda complementar los estudios para encaminar al mejoramiento genético en este cultivo.

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.

BEEBE, S.; J. RENGIFO; E. GAITÁN; M. C. DUQUE, AND J. TOHME. 2001. Diversity and Origin of Andean Landraces of Common Bean. *Crop Sci.* 41:854-862.pg

BLAS, R.; J. RIBAUT; M. WARBURTON; J. CHURA & R. SEVILLA. 2002. Análisis molecular de razas de maíz peruano con marcadores AFLP y Microsatélites. En Simposiun "El mejoramiento genético de las plantas en el Perú". Sociedad Peruana de Genética (3): 241-250 pg.

BOCANEGRA, S. Y ECHANDI, E. 1969. Cultivo de menestra en el Perú. Ministerio de agricultura- misión agrícola de la Universidad de Carolina del Norte. Lima- Perú.

BRACKEGG. ANTONIO 2000 Ecología del Perú editorial bruño lima 495 pg.

CERRATE, V.A.1981. Cultivo de habas (*vicia faba* L.)Departamento de la Fitotecnia. Proyecto de menestras. UNALM. Lima, Perú.

CRISCI, J.V.; LÓPEZ, -M.F. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Monografía N°26, Serie de Biología, Programa de Monografías Científicas, OEA, Washington D.C, U.S.A. 128 pg.

CRUZ B.J., CAMARENA M.F., PIERRE B.J, HUARINGA J.A. BLAS S.R. (2006) Evaluación agromorfológica y caracterización molecular de la ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) Universidad Nacional Agraria la Molina, lima Perú, 456pg.

CUBERO, J.I. Y MORENO, MT. 1983. Leguminosas de granos España: Editorial Mundi-Prensa. Castello 37 pg.

DIAZ J.M. 2005 Diversidad genética y estructura poblacional de germoplasma andino de frijol común *Phaseolus vulgaris* Tesis Universidad Nacional de Colombia sede Palmira Colombia.

DIAZ- RUIZ 2010. Caracteres destacables de las variedades de habas señalados por los productores del valle de Tlachichuca, puebla. In: Libro de resúmenes de foreo regional de agricultura sostenible. Sociedad mexicana de agricultura Sostenible, colegio de post-graduados, campus puebla. Mexico.57-60.pg

DOYLE, JJ; DOYLE, JL. 1990. Isolation of DNA from small amounts of plant tissues. *Focus* 12:13-15 pg.

FERREIRA, M; GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia, Embrapa - Cenargen. 220 pg.

FREIFELDER, D. 1991 Técnicas de Bioquímica y Biología molecular 1ra Edición. Editorial Reverse Mexicana. 234-260 pg.

GÓMEZ O. J.; M. W. BLAIR; B. E. FRANKOW-LINDBERG, AND U. GULLBERG. 2004. Molecular and Phenotypic Diversity of Common Bean Landraces from Nicaragua. *Crop Sci.* 44:1412-1418.

GONZÁLEZ, A.; PITA, J.M. 2001. Conservación y Caracterización de Recursos Filogenéticos. I.N.E.A. Valladolid. 279 pg.

JORDAN AGUILAR Bladimir 2011 Tesis- Contenido de taninos y caracterización molecular de variedades de haba (*vicia faba* L.) cultivadas por agricultores colegio de post-graduados Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas Puebla-México 80 pg.

KHANDKA, D.; A. NEJIDAT & A. GOLAN-GOLDHIRSH. 1996. Polymorphism and DNA markers for asparagus cultivars identified by random amplified polymorphic DNA. *Euphytica* 87:39-44 pg.

PICCA, A.; HELGUERA, M.; SALOMÓN, N. Y CARRERA, A. 2004. Marcadores Moleculares. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA. Argentina

PICHARDO RIEGO JUAN CARLOS (2010) Crecimiento y rendimiento de haba (*Vicia faba*L.) en ambientes contrastantes- tesis-post-graduados- México. 376pg.

POWELL W, MARGENTA M, ANDRE C, HANFREY M, VOGEL J, TINGEY S, RAFALSKY A (1996) The utility of RFLP, RADP, AFLP and SSR (microsatellites) markers for germoplasm analysis. *Mol. Breed* 2: 225-238 pg.

QUIROZ, O; PHILIPS, W; BERTRAND, B. 1997. Uso de los marcadores moleculares para la evaluación, la conservación y el uso de la diversidad genética. In CATIE, Actas de la 3era Semana Científica. Programa de Investigación, Turrialba, Costa Rica. 267 p.

RAFALSKI JA (2002) Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr.Opin. Plant Biol.* 5: 94-100 pg.

RIOS REYNOSO José Paulino 2003 Manual del cultivo de haba Caritás Huancayo Perú 20 pg.

ROCHA, P. 2002. Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. *Palmas.* 23(3): 9-17. pg.

ROGERS, SO; BENDICH, AJ. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. In Gelvin, SB; Schilperoort, RA. eds. *Plant molecular biology manual.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 1-10 pg.

ROHLF, F. (2000) NTSYS PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis for the IBM PC Microcomputers (and compatibles), version 2.1 User guide. Applied Biostatistics Inc. Stony Brook, New York, USA. 39 pg.

ROSAS L. 1998. Semillas de habas. Perú. Tesis UNALM.

RUIZ SALAZAR Reguo 2009 Análisis de la Diversidad Genética de *Phaseolus coccineus* de la sub-provincia Carso Husteco de México tesis Instituto Politécnico Nacional Centro de Biotecnología Genómica. 81pg.

SEVILLA, PR; HOLLE, SM. 2004. Recursos Genéticos Vegetales. Lima, Ediciones Torre Azul SAC. 445 pg.

SNEATH, PHA; SOKAL, RR. 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. Freeman W.H & Co, San Francisco. 573 pg.

VELASCO, R. 2005. Marcadores moleculares y la extracción de ADN. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias-Universidad del Cauca. 3(1):14-18 pg.

VIDAL NIÑO Merino 2005 Guía agronómica cultivo de haba- Churin 24 pg.

VIRK S, ZHU J, NEWBURY H, BRYAN G, JACKSON M, FORD-LLOYD B (2000) Effectiveness of different classes of molecular markers for classifying and revealing variations in rice (*Oryza sativa*) germplasm. *Euphytica* 112: 275-284 pg.

WINZER, N.; RENZO, M.; OLMOS, S. 2004. Métodos para estimar la variabilidad genética. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA. Argentina

ZABEAU, M. (1993) Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European patent application 60-64 pg.

ZOHARY, D. 1970 Centers of diversity and centers of origin. *Scien*, publ. Oxford.Londres.33-42 pg.

## **“Análisis de la diversidad genética de 50 accesiones de habas (*Vicia faba* L.), mediante marcadores moleculares AFLP en la región de Huancavelica”**

Luisa Y. MELGAR AVILA, Rolando PORTA CHUPURGO.

Programa de Investigación en cultivo de leguminosas, Escuela Académico Profesional de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Huancavelica.  
Ciudad Universitaria “Común Era” Acobamba- Huancavelica- Perú.

### RESUMEN

La especie *Vicia faba* L., es una de las leguminosas más importantes a nivel mundial y en Perú, debido fundamentalmente a la calidad y aceptación de su fruto tanto en verde como en grano seco. Es importante mencionar que el haba tiene un alto porcentaje de polinización cruzada y por lo tanto el flujo de genes entre diferentes genotipos, genera altos índices de diversidad genética. En el banco de germoplasma de la EAP Agronomía, existe la preocupación de que haya duplicados genéticos, y estudios anteriores de caracterización morfológica no han asegurado la identificación de estos duplicados. Por ello se procedió a realizar el análisis molecular de 50 accesiones de habas conservadas en el banco de germoplasma, esto mediante marcadores moleculares AFLP para evaluar el grado de diversidad, según los resultados se probaron 23 combinaciones de primers AFLP, de las cuales se emplearon 7 primers por presentar mayor polimorfismo. En este estudio se halló 139 bandas polimórficas, representando el 32.25% de polimorfismo. De acuerdo al dendograma obtenido a un coeficiente de similitud de 0,59 se formó dos grupos, que están diferenciados entre sí, el primer grupo constituido por 44 accesiones y el segundo grupo conformado por 6 accesiones presentando un grado de similitud entre las accesiones evaluadas. Según este análisis permitió la diferenciación del material estudiado observándose una diversidad genética y no encontrándose una duplicidad entre el germoplasma estudiado. Consecuentemente, esta diversidad genética permitirá identificar genes por presentar características favorables, necesarias para su utilización en programas de mejoramiento genético.

**Palabras Clave:** *Vicia faba* L., diversidad genética, caracterización molecular, AFLP, accesiones, variabilidad genética.



## SUMMARY

The species ***Vicia faba L.***, is one of the most important legumes worldwide and in Peru, mainly due to the quality and acceptance of its fruit as green as dry beans. It is noteworthy that the bean has a high percentage of cross pollination and therefore gene flow between different genotypes, generates high levels of genetic diversity. In the genebank of Agronomy EAP, there is concern that there is genetic duplicates, and previous studies have not secured morphological identification of these duplicates. So we proceeded to perform the molecular analysis of 50 accessions of beans preserved in the gene bank, this by AFLP molecular markers to assess the degree of diversity, the results were tested 23 combinations of AFLP primers, which were used 7 primers to present greater polymorphism. This study found polymorphic bands 139, representing 32.25% of polymorphism. According to the dendrogram obtained a similarity coefficient of 0.59 was formed two groups, which are differentiated from each other, the first group consisted of 44 accessions and the second group comprised six accessions showing a degree of similarity between the accessions. According to this analysis allowed differentiation of the material studied and observed genetic diversity found no duplication between the germplasm studied. Consequently, this will identify genes genetic diversity by presenting favorable characteristics necessary for use in breeding programs.

**Key words:** *Vicia faba L.*, genetic diversity, molecular markers, AFLP, accessions, genetic variability.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el Perú posee una alta diversidad genética. El cultivo de haba es una especie introducida, por ello con una variabilidad reducida que al cultivarse en los diferentes ecosistemas de la zona andina se diversificó, de esta manera ampliando la diversidad genética que se desconoce en su totalidad. Esta diversidad de especies cultivadas no es el resultado solamente de eventos biológicos, sino de la interacción, durante cientos de generaciones.

En el Perú el haba (***Vicia faba L.***), es de gran importancia económica y social, ocupa el segundo lugar en cuanto a producción en nuestro país (**Pichardo, 2010**), es una leguminosa que se adapta a las zonas alto andinas, es muy apreciada por sus cualidades

alimenticias y nutritivas, puesto que provee proteínas y minerales, cumpliendo un rol fundamental en la dieta del poblador andino, **(Pichardo, 2010)**. El producto de este cultivo puede ser consumido en grano verde o seco. Asimismo es usada como forraje y abono verde **(Vidal 2005)**, y contribuye al mejoramiento de suelos por su capacidad de fijar nitrógeno al suelo, así como ofrece una excelente alternativa en la rotación de cultivos.

Por otra parte la diversidad genética se estudiaba inicialmente mediante marcadores morfológicos, sin embargo en este tipo de estudios fenotípicos están influenciados por el medio ambiente y por el estado de desarrollo vegetal **(Quiroz et al., 1997)**; por ello recurrimos a los marcadores moleculares por presentar muchas ventajas, especialmente porque se trabaja directamente con el material genético (ADN) y se usan para mantener la identidad de las accesiones, para identificar duplicados en los bancos de germoplasma, así como para estimar el grado de similitud entre individuos de una accesión o entre accesiones dentro de una colección. **(González y Pita, 2001)**.

En la ejecución de este trabajo se utilizó la técnica de AFLP porque presenta un alto poder de detección de la variabilidad genética, y de esta manera poder evaluar el grado de diversidad genética de las 50 accesiones de habas **(*Vicia faba L.*)**, que cuenta el banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Agronomía de la Facultad de Ciencias Agrarias, ya que, el germoplasma del material estudiado tiene un alto porcentaje de polinización cruzada y por lo tanto el flujo de genes entre diferentes genotipos, genera altos índices de diversidad genética **(Virk et al., 2000)**, esto es un indicio de la existencia de variabilidad, consecuentemente, esta diversidad genética permitirá identificar genes con características favorables, necesarios para su utilización en programas de mejoramiento genético; es por ello que debe ser estudiado mediante marcadores moleculares, para una adecuada identificación y evitar la duplicación de las accesiones presentes en el banco de germoplasma.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La siembra de las 50 accesiones de haba se realizó en la Estación Experimental "Común Era", durante la campaña agrícola de secano 2010 a 2011. La caracterización molecular se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). El material que se utilizó para la

caracterización molecular fue seleccionado por presentar buenas características agronómicas, en la extracción del ADN se utilizaron folíolos del tercio superior, evaluándose la cantidad y calidad de ADN; en el genotipado de las poblaciones se utilizó la técnica de polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), la detección y evaluación de bandas fue por electroforesis y en la evaluación para el análisis de bandas de ADN se utilizó la técnica de tinción en nitrato de plata, visualizándose bandas polimórficas. Para el diseño de investigación, se elaboró una matriz de similitud usando el coeficiente de similitud Simple Matching (SM) y para la construcción del dendograma se agrupó con el algoritmo UPGMA (Un-weighted Pair-Grouping Method using arithmetic Averages) (Hairet al., 1992).

Tabla N°1: Material vegetal de haba

Origen: Perú – Procedencia: Huancavelica			
Código	Accesión	Código	Accesión
EAPA 01	Usguusgu	EAPA 14	Blanca checccche
EAPA 02	Verde moro	EAPA 15	Loro moro
EAPA 03	Pucapacra	EAPA 16	Verde lochuq quieto
EAPA 04	Verde yuracc	EAPA 17	Osqo verde
EAPA 05	Yuracc moro	EAPA 18	Quiyupucu
EAPA 06	Pucaoxo	EAPA 19	Verde jillgay
EAPA 07	Quilla uspac	EAPA 20	Oxoinchi
EAPA 08	Chiuchi puca	EAPA 21	Ccellccayyuracc neto
EAPA 09	Uchuy puco chico	EAPA 22	Pacrajillgay
EAPA 10	Guinda yarita blanca	EAPA 23	Yanayuracc
EAPA 11	Pacrajellquecc	EAPA 24	Oxo mediano
EAPA 12	Verde mani	EAPA 25	Cruzado qerjay
EAPA 13	Puca puerto	EAPA 26	Rosado enchik

Origen: Perú – Procedencia: Huancavelica			
Código	Accesión	Código	Accesión
EAPA 27	Señorita blanca	EAPA 39	Manijillayana
EAPA 28	Ñutuusqu	EAPA 40	Uchuyutupicsa
EAPA 29	Collgay verde	EAPA 41	Orasancellccay
EAPA 30	Pucajuito	EAPA 42	Yanayuraq señorita
EAPA 31	Oqsopacra	EAPA 43	Pacaysito lindo
EAPA 32	Verde yana	EAPA 44	Puitopacra
EAPA 33	Puco pacay	EAPA 45	Ocho chipo yuraq
EAPA 34	Yana ñuto	EAPA 46	Gillo moro
EAPA 35	Moradito blando	EAPA 47	Jergón
EAPA 36	Checchesito	EAPA 48	Yanagillo
EAPA 37	Blanco mejorado	EAPA 49	Mancha quillo
EAPA 38	Uchuyyanainchi	EAPA 50	Verde lachog

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

- **Marcadores moleculares AFLP:** Se evaluaron inicialmente 23 primers en las 50 accesiones de haba de los cuales se utilizaron siete combinaciones de primers por presentar mayor polimorfismo. Empleando las siete combinaciones de primers, se generaron un total de 431 bandas amplificadas donde 292 bandas fueron monomórficas representando un 67.74% y 139 bandas fueron polimórficas, representando un 32.25%.

Tabla N°2: Total de combinaciones de primers y el polimorfismo generado.

Combinación	Número total de bandas	Bandas monomórficas	Bandas polimórficas	Porcentaje de polimorfismo
E32 M35	63	49	14	22.22
E13 M59	58	36	22	37.93
E32 M59	62	42	20	32.25
E38 M59	49	26	23	46.93
E12 M41	54	34	20	37.03
E12 M35	83	62	21	25.30
E13 M35	62	43	19	30.64
Total	431	292	139	32.25

La combinación E12-M35 es la que generó una mayor cantidad de bandas amplificadas en comparación a la combinación E38-M59 que generó la menor cantidad de bandas amplificadas. Sin embargo esta combinación de E38-M59 fue la que generó el mayor

porcentaje de polimorfismo mientras que la combinación E32-M35 generó un menor porcentaje de polimorfismo. Sin embargo la combinación E38-M59 es el mejor por generar el mayor porcentaje de polimorfismo con un 46.93%, lo que podría indicar que tiene un alto poder de discriminación; lo cual podría estar indicando el buen desempeño de la técnica con marcadores AFLP pues se encontró variabilidad a nivel molecular entre las 50 accesiones de haba. En base a estos resultados se encontró variabilidad entre las 50 accesiones de haba, lo cual se vio reflejado en el polimorfismo detectado con marcadores AFLP. Ensayos preliminares con la técnica de marcadores AFLP mostraron que es altamente polimórfica y reproducible, confiriendo un alto grado de confiabilidad (Ruiz, 2009). En otras investigaciones utilizando la técnica de marcadores AFLP y el uso de combinaciones de primers en una *Phaseolus vulgaris* L. se evidenció polimorfismo genético (Cruz et al., 2006). Asimismo, en otros estudios en haba mostraron un alto nivel de polimorfismo, argumentando que el polimorfismo genético, puede estar asociado a que es una planta parcialmente alógama, la cual tiende a favorecer la conservación de un alto porcentaje de heterocigotos. (Cruz et al., 2006).

Por otra parte el cultivo de haba se le considera como una planta autógama a esto se le puede atribuir que las 16 combinaciones no utilizadas en la caracterización molecular presentaron un bajo nivel de polimorfismo, lo cual concuerda con otras investigaciones como la ñuña que es una leguminosa y sostienen que por ser autógama presenta bajo nivel de polimorfismo en primers no utilizados (Cruz et al., 2006). En la soya (*Glycine max* L.), en la que se encontró bajo nivel de polimorfismo, indica que tiene una limitada diversidad genética en los cultivos tradicionales, lo cual hace la identificación de marcadores más difícil (Khandka et al., 1996).

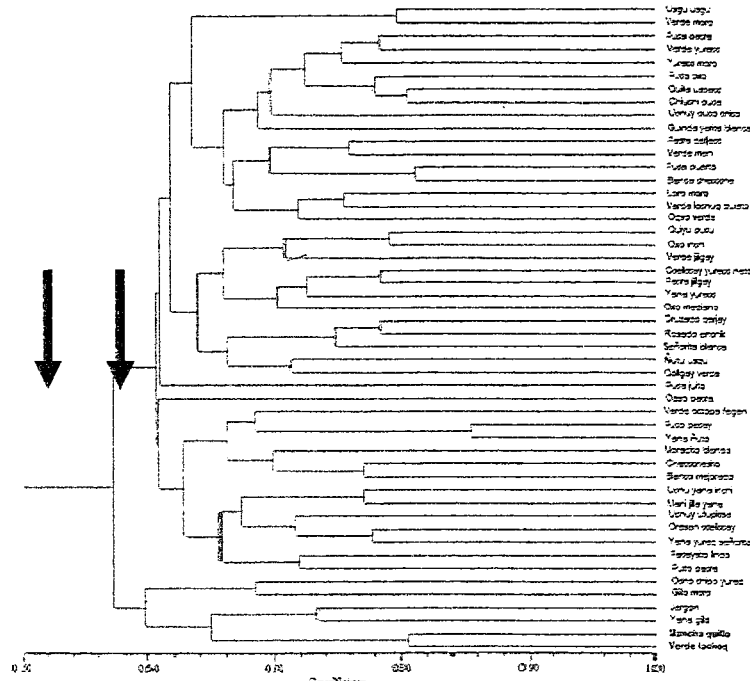
- **Análisis de diversidad genética:** En el dendograma obtenido del análisis de las 50 accesiones de haba donde: en un coeficiente de similitud de 0.59, se formaron dos grupos; el primer grupo (a) es un gran grupo constituido por 44 accesiones (Usguusgu, Verde moro, Pucapacra, Verde yuracc, Yuracc moro, Pucaoxo, Quilla uspac, Chiuchi puca, Uchuy puco chico, Guinda yarita blanca, Pacrajellquecc, Verde mani, Puca puerto, Blanca checccche, Loro moro, Verde lochuq quieto, Osqo verde, Quiyupucu, Verde jillgay, Oxoinchi, Ccellcayyuracc neto, Pacrajillgay, Yanayuracc, Oxo mediano, Cruzado

qerjay, Rosado enchik, Señorita blanca, Ñutuusqu, Collgay verde, Pucajuito, Oqsopacra, Verde yana, Puco pacay, Yana ñuto, Moradito blando, Checcchesito, Blanco mejorado, Uchuyyanainchi, Manijillayana, Uchuyutupicsa, Orasancellccay, Yanayuraq señorita, Pacaysito lindo, Puitopacra) y el segundo grupo (b) está conformado por 6 accesiones (Ocho chipo yuraq, Gillo moro, Jergón, Yanagillo, Mancha quillo, Verde lachoq). De acuerdo al dendograma y la matriz de similitud obtenidos, hay dos aspectos importantes que destacar: de las 50 accesiones de haba, con un coeficiente de similitud de 0,59 se definieron dos grandes grupos bien diferenciados, esto nos indica que el primer grupo presenta mayor semejanza entre las 44 accesiones y el segundo grupo conformado por 6 son semejantes entre sí; siendo así que entre el primer grupo y segundo grupo la similitud entre estos dos se alejan.

Sin embargo, a un coeficiente de similitud de 1.0, todos son diferentes, no hay duplicados en el germoplasma analizado y hay probablemente variabilidad entre los genotipos evaluados. Estos resultados son muy favorables ya que esta variabilidad es de gran importancia debido a que al tener duplicados en los bancos de germoplasma reduce la eficiencia de manejo del banco e incrementa los costos de mantención, regeneración, caracterización y documentación, entre las 50 accesiones confiere mayor probabilidad de seleccionar accesiones con buenas características agronómicas y poder encaminar hacia objetivos de mejoramiento genético.

La diversidad genética entre las accesiones encontradas indicaría probablemente dos causas, la primera biológica, debido a que el haba es una planta parcialmente alógama esto indicaría que existe un constante intercambio de materiales genéticos y la posible recombinación entre ellos lo que hace probable que existan altos índices de diversidad. Esta tendencia se ha encontrado en estudios realizados por Jordan (2011), que concuerda que en una planta alógama se le atribuye la alta diversidad por el flujo de genes entre los diferentes genotipos, la cual tiende a favorecer la conservación de un alto porcentaje de heterocigotos. La segunda causa, probablemente vendría a ser la metodológica utilizada por los agricultores y la variabilidad de habas podría ocurrir en el momento de la cosecha como, puesto que recogen los granos pues hacen este proceso sin una selección determinada o simplemente las mezclas pueden originarse por actividades culturales como juegos, regalos o deudas.

Figura N°4: Dendograma que agrupa 50 accesiones de haba con 7 marcadores de AFLP a un coeficiente de 0,59



El origen geográfico de las colectas no se asocio con la agrupación del dendograma, este estudio es un primer acercamiento al conocimiento de la diversidad genética entre genotipos cultivados de haba en Huancavelica y se demostró que la técnica AFLP empleada es útil para evaluar la diversidad genética a nivel de variedades. En términos generales con los marcadores AFLP se evidenció una amplia diversidad genética de las habas. Con estos resultados se observa que hay diversidad genética entre las accesiones de haba, afirmando que es una planta parcialmente alógama, lo cual es favorecido por la polinización cruzada y por lo tanto el flujo de genes entre diferentes genotipos genera altos índices de diversidad (Cruz *et al.*, 2006), que podrían utilizarse en programas de conservación de la biodiversidad.

## CONCLUSIONES

1. El uso de marcadores moleculares AFLP permitió detectar diversidad genética de las 50 accesiones de haba.

2. Se formaron dos grupos en un coeficiente de similitud de 0.59, el primer grupo constituido por 44 accesiones y el segundo grupo está conformado por 6 accesiones y a un coeficiente de similitud de 1.0, todos son diferentes, no hay duplicados en el germoplasma analizado y evidencia la variabilidad entre los genotipos evaluados.

### REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. CRUZ B.J., CAMARENA M.F., PIERRE B.J, HUARINGA J.A. BLAS S.R. ( S F) Evaluación agromorfológica y caracterización molecular de la ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) Universidad Nacional Agraria la Molina, lima Perú, 456pg.
2. DIAZ J.M. 2005 Diversidad genética y estructura poblacional de germoplasma andino de frijol común *Phaseolus vulgaris* Tesis Universidad Nacional de Colombia sede Palmira Colombia.
3. GONZÁLEZ, A.; PITA, J.M. 2001. Conservación y Caracterización de Recursos Filogenéticos. I.N.E.A. Valladolid. 279 pg.
4. JORDAN AGUILAR Bladimir 2011 Tesis- Contenido de taninos y caracterización molecular de variedades de haba (*vicia faba* L.) cultivadas por agricultores colegio de post-graduados Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas Puebla- México 80pg.
5. KHANDKA, D.; A. NEJIDAT & A. GOLAN-GOLDHIRSH. 1996. Polymorphism and DNA markers for asparagus cultivars identified by random amplified polymorphic DNA. *Euphytica* 87:39-44 pg.
6. RUIZ SALAZAR Reguo 2009 Análisis de la Diversidad Genética de *Phaseolus coccineus* de la sub-provincia Carso Husteco de México tesis Instituto Politécnico Nacional Centro de Biotecnología Genómica. 81pg.
7. VIRK S, ZHU J, NEWBURY H, BRYAN G, JACKSON M, FORD-LLOYD B (2000) Effectiveness of different classes of molecular markers for classifying and revealing variations in rice (*Oryza sativa*) germplasm. *Euphytica* 112: 275-284 pg.



## Anexos

**Anexo N° 1:** Protocolo de extracción con nitrógeno líquido establecido por Doyle & Doyle (1990), con algunas modificaciones

1. Material vegetal almacenado a -20 °C  
↓
2. Pulverizar con nitrógeno líquido el tejido foliar colectado de preferencia de hojas jóvenes aproximadamente 100 mg.  
↓
3. El material vegetal pulverizado se transfiere en un tubo eppendorf de 1,5 ml hasta la marca de de 500 µl, y resuspender 700 µl de buffer CTAB (2X), Adicionando 2 µl de β mercaptoetanol. Agitar suavemente e incubar por 30 minutos a 65 °C.  
↓
4. Retirar de la incubadora y dejar reposar por espacio de 2 minutos a temperatura ambiente. Luego agregar 700 µl cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) para luego mezclarlo suavemente el tubo y centrifugar por 10 min a 14 000 rpm.  
↓
5. Transferir el sobrenadante resultante a un nuevo tubo Eppendorf.  
↓
6. Adicionar 50 µl de CTAB (10X), mezclar suavemente para homogenizar todo el líquido, adicionarle 700 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclarlo suavemente y centrifugarlo por 10 min a 14 000 rpm.  
↓
7. Transferir el sobrenadante resultante de la centrifugación a un nuevo tubo Eppendorf.  
↓
8. Agregar, al nuevo tubo (500 µl aprox.) de Isopropanol helado para precipitar el ADN, Incubar a -20 °C durante 40 min.  
↓
9. Llevar a -20 °C por 30 minutos y centrifugar a 14000 rpm por 20 minutos. Eliminar el sobrenadante cuidando de no perder el pellet.  
↓

10. Lavar El pellet dos veces con 500  $\mu$ l de etanol al 70 %y centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos, descartar el etanol. Segundo lavado con 500  $\mu$ l de etanol al 90 % centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos, descartar el etanol.



11. Permitir que el ADN (pellet) seque a temperatura ambiente durante 1 hora, invirtiendo el tubo.



12. Luego resuspender el ADN (pellet), en 80  $\mu$ l de buffer T10E1 ó agua MiliQ estéril y se almaceno a -20 °C.

#### **Anexo N°2:** Preparación del gel agarosa 1%

1. Pesar 0.6 g de agarosa



2. Llevar a un Erlenmeyer y agregar 6 ml de Buffer TBE 10X y 54ml de agua destilada.



3. Calentar en un horno microondas por 1 minuto



4. Verificar si la agarosa se ha disuelto completamente, sino calentar nuevamente por 40 segundos.



5. Dejar enfriar un poco y verter en la bandeja con el peine y los extremos sellados en una mesa nivelada.



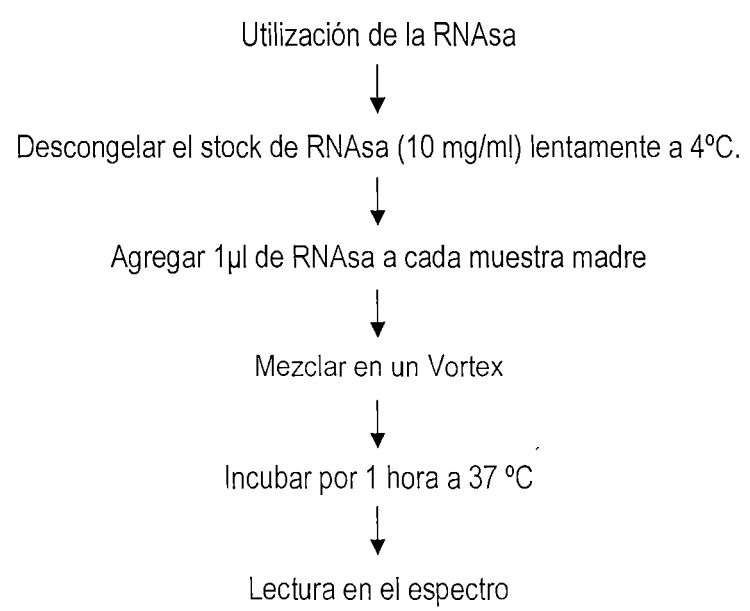
6. Dejar solidificar el gel.



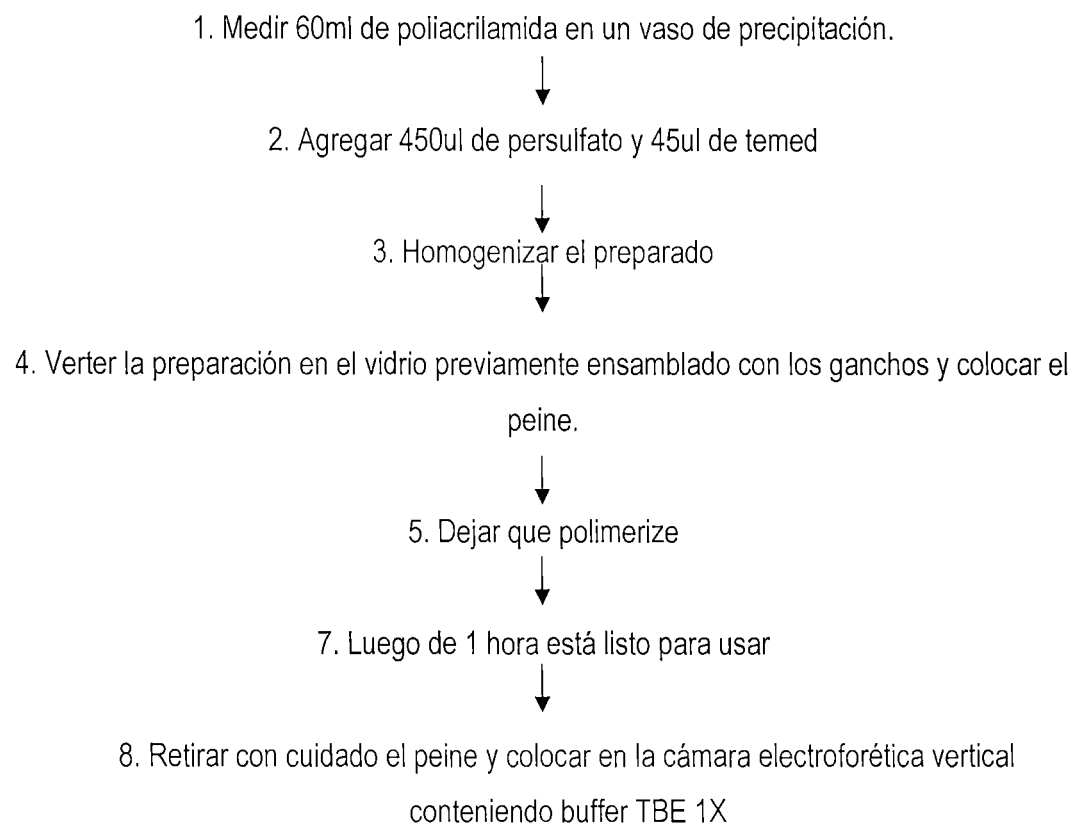
7. Luego de 30 minutos está listo para usar.

8. Retirar con cuidado el peine y sumergir la bandeja en la cámara de electroforesis conteniendo buffer TBE 1X

**Anexo N°3:** Preparación de las muestras para la cuantificación y calidad del ADN.



**Anexo N°4:** Preparación del gel de poliacrilamida al 6%



Anexo N°5: Matriz Básica de datos de 50 muestras de haba

Entrada	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Marcador																		
E32-M35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0
	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1
	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1
	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0
	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1
	Marcador	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E12-M35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1
	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1
	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0

Marcador	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
E13-M35	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1
	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1
	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0
	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Marcador	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E38-M59	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0
	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	

	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
Marcador	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0		
E13-M59	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1		
	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1		
	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0		
	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1		
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	
	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	
	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	
	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	
	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	
	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	
	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	
1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Marcador	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
E32-M59	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	
	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	
	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	
	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Marcador	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E12-M41	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0
	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

Entrada	19	20	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
Marcador															
E32-M35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0



Marcador	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
E12-M35	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	
	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	
	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	
	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	
	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	
	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	
	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Marcador	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
E13-M35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	
	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	
	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	
	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	
	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	
	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	

Marcador	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	
E38-M59	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	
	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	
	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	
	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	
	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Marcador	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	
E13-M59	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	
	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	
	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	
	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	
	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	
	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	
	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	
	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1		
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	

	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0
	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Marcador	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
E32-M59	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0
	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1
	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1
	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0
	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Marcador	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E12-M41	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0
	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0
	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	
	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1

Entrada	35	36	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	
Marcador																
E32-M35	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	
	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	
	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	
	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	
	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Marcador	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	
E12-M35	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	
	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	
	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	
	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	
	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
Marcador	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E13-M35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Marcador	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
E38-M59	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1
	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1
	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	

	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	
	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	
	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	
Marcador	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	
E13-M59	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	
	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	
	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	
	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	
	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	
	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1
0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
Marcador	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
E32-M59	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	
	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	
	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	
	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1

	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Marcador	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
E12-M41	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1
	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0
	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Anexo N° 6: Matriz de similitud de las 50 accesiones de haba analizada mediante AFLP.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	1											
2	0.8	1										
3	0.68	0.76	1									
4	0.65	0.75	0.78	1								
5	0.59	0.6	0.67	0.76	1							
6	0.63	0.69	0.68	0.74	0.7	1						
7	0.58	0.64	0.69	0.69	0.68	0.76	1					
8	0.61	0.6	0.65	0.66	0.65	0.68	0.68	1				
9	0.64	0.64	0.65	0.66	0.66	0.69	0.73	0.81	1			
10	0.67	0.71	0.78	0.73	0.67	0.69	0.7	0.69	0.69	1		
11	0.62	0.66	0.71	0.7	0.7	0.68	0.68	0.63	0.66	0.75	1	
12	0.61	0.65	0.75	0.75	0.71	0.71	0.65	0.6	0.57	0.7	0.79	1
13	0.63	0.66	0.76	0.67	0.68	0.67	0.65	0.62	0.58	0.75	0.77	0.81
14	0.59	0.63	0.7	0.64	0.64	0.65	0.69	0.59	0.58	0.7	0.7	0.69
15	0.6	0.61	0.66	0.72	0.66	0.71	0.67	0.63	0.63	0.68	0.66	0.7
16	0.58	0.61	0.69	0.73	0.66	0.68	0.7	0.68	0.68	0.67	0.71	0.7
17	0.55	0.58	0.6	0.6	0.63	0.65	0.67	0.68	0.64	0.59	0.66	0.68
18	0.59	0.6	0.61	0.63	0.58	0.64	0.63	0.62	0.63	0.67	0.68	0.72
19	0.65	0.68	0.6	0.63	0.6	0.69	0.55	0.55	0.58	0.68	0.71	0.74
20	0.5	0.55	0.64	0.58	0.6	0.63	0.55	0.58	0.55	0.62	0.64	0.66
21	0.53	0.56	0.54	0.54	0.57	0.67	0.5	0.55	0.52	0.59	0.63	0.62
22	0.49	0.49	0.53	0.58	0.6	0.61	0.56	0.55	0.5	0.6	0.58	0.6
23	0.61	0.55	0.58	0.59	0.62	0.6	0.6	0.63	0.63	0.59	0.52	0.58
24	0.57	0.54	0.6	0.59	0.59	0.63	0.58	0.57	0.55	0.65	0.65	0.67
25	0.58	0.57	0.59	0.63	0.6	0.68	0.64	0.7	0.65	0.66	0.69	0.64
26	0.53	0.51	0.58	0.59	0.58	0.62	0.65	0.64	0.65	0.64	0.58	0.58
27	0.49	0.49	0.57	0.54	0.61	0.57	0.62	0.63	0.59	0.59	0.64	0.59
28	0.53	0.54	0.59	0.62	0.65	0.56	0.63	0.63	0.63	0.64	0.72	0.67
29	0.45	0.54	0.56	0.66	0.59	0.6	0.55	0.58	0.55	0.59	0.66	0.61
30	0.54	0.54	0.6	0.59	0.65	0.6	0.6	0.57	0.61	0.59	0.66	0.61
31	0.54	0.54	0.59	0.59	0.63	0.63	0.65	0.63	0.58	0.59	0.66	0.63
32	0.54	0.58	0.63	0.56	0.6	0.6	0.67	0.65	0.64	0.63	0.68	0.63
33	0.53	0.55	0.58	0.53	0.65	0.58	0.65	0.7	0.67	0.62	0.63	0.64
34	0.53	0.53	0.62	0.58	0.59	0.58	0.63	0.64	0.67	0.61	0.67	0.66
35	0.55	0.59	0.61	0.58	0.54	0.57	0.55	0.59	0.52	0.62	0.67	0.65
36	0.57	0.61	0.71	0.66	0.63	0.6	0.61	0.64	0.63	0.67	0.65	0.64
37	0.57	0.6	0.68	0.71	0.66	0.62	0.61	0.61	0.57	0.65	0.65	0.64
38	0.52	0.52	0.55	0.63	0.58	0.57	0.63	0.58	0.59	0.59	0.67	0.6
39	0.53	0.49	0.57	0.58	0.58	0.53	0.6	0.56	0.55	0.6	0.65	0.58



40	0.59	0.55	0.61	0.57	0.61	0.55	0.62	0.62	0.63	0.64	0.65	0.59
41	0.57	0.55	0.63	0.63	0.62	0.65	0.65	0.68	0.7	0.73	0.63	0.57
42	0.58	0.58	0.63	0.61	0.61	0.63	0.63	0.58	0.63	0.64	0.67	0.62
43	0.59	0.58	0.54	0.57	0.6	0.58	0.63	0.6	0.62	0.6	0.6	0.56
44	0.64	0.6	0.59	0.6	0.6	0.62	0.61	0.54	0.57	0.61	0.62	0.57
45	0.48	0.54	0.56	0.56	0.55	0.59	0.57	0.54	0.58	0.54	0.58	0.54
46	0.47	0.47	0.5	0.55	0.53	0.5	0.54	0.61	0.58	0.52	0.55	0.51
47	0.54	0.54	0.58	0.58	0.59	0.65	0.63	0.57	0.6	0.64	0.68	0.61
48	0.49	0.46	0.51	0.51	0.53	0.48	0.52	0.56	0.6	0.55	0.57	0.5
49	0.58	0.63	0.57	0.64	0.58	0.55	0.59	0.62	0.63	0.55	0.57	0.58
50	0.63	0.6	0.53	0.62	0.58	0.55	0.53	0.55	0.6	0.55	0.52	0.54

	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
13	1										
14	0.74	1									
15	0.66	0.71	1								
16	0.63	0.58	0.76	1							
17	0.62	0.6	0.68	0.76	1						
18	0.65	0.65	0.66	0.71	0.71	1					
19	0.72	0.63	0.65	0.64	0.64	0.79	1				
20	0.68	0.64	0.66	0.62	0.58	0.7	0.66	1			
21	0.6	0.58	0.62	0.6	0.62	0.63	0.69	0.6	1		
22	0.63	0.6	0.6	0.62	0.63	0.63	0.59	0.65	0.68	1	
23	0.53	0.55	0.58	0.63	0.61	0.58	0.58	0.58	0.56	0.69	1
24	0.6	0.62	0.6	0.57	0.63	0.66	0.7	0.62	0.6	0.65	0.77
25	0.65	0.56	0.65	0.68	0.67	0.72	0.7	0.59	0.62	0.65	0.65
26	0.62	0.62	0.64	0.63	0.61	0.65	0.61	0.62	0.55	0.66	0.74
27	0.64	0.61	0.58	0.56	0.68	0.61	0.59	0.63	0.58	0.65	0.56
28	0.68	0.65	0.63	0.64	0.65	0.65	0.67	0.68	0.59	0.69	0.64
29	0.62	0.58	0.61	0.6	0.61	0.58	0.6	0.59	0.59	0.63	0.54
30	0.63	0.63	0.68	0.61	0.63	0.56	0.58	0.6	0.56	0.62	0.55
31	0.65	0.63	0.67	0.64	0.7	0.63	0.68	0.55	0.63	0.6	0.55
32	0.68	0.62	0.6	0.65	0.64	0.68	0.64	0.58	0.62	0.59	0.6
33	0.68	0.59	0.6	0.63	0.65	0.63	0.57	0.56	0.58	0.58	0.57
34	0.61	0.61	0.64	0.66	0.64	0.7	0.67	0.62	0.59	0.58	0.59
35	0.64	0.57	0.63	0.59	0.63	0.68	0.68	0.64	0.65	0.61	0.58
36	0.66	0.6	0.64	0.63	0.58	0.58	0.61	0.6	0.62	0.62	0.61
37	0.65	0.58	0.67	0.65	0.61	0.56	0.61	0.59	0.62	0.71	0.61
38	0.54	0.6	0.62	0.65	0.6	0.6	0.58	0.57	0.6	0.68	0.58

39	0.55	0.6	0.59	0.68	0.6	0.61	0.53	0.61	0.58	0.68	0.66
40	0.6	0.61	0.59	0.63	0.56	0.6	0.59	0.6	0.54	0.61	0.69
41	0.56	0.59	0.64	0.65	0.6	0.62	0.58	0.58	0.63	0.62	0.68
42	0.61	0.58	0.66	0.65	0.6	0.65	0.66	0.61	0.63	0.63	0.69
43	0.54	0.58	0.58	0.62	0.6	0.6	0.58	0.57	0.61	0.63	0.72
44	0.53	0.62	0.63	0.61	0.58	0.55	0.58	0.53	0.56	0.56	0.65
45	0.52	0.55	0.6	0.63	0.61	0.55	0.58	0.56	0.59	0.6	0.6
46	0.49	0.5	0.57	0.61	0.58	0.56	0.51	0.49	0.52	0.55	0.58
47	0.65	0.62	0.68	0.64	0.63	0.66	0.64	0.59	0.59	0.6	0.58
48	0.51	0.53	0.53	0.53	0.58	0.57	0.5	0.55	0.47	0.53	0.53
49	0.57	0.57	0.6	0.58	0.58	0.5	0.52	0.51	0.48	0.55	0.56
50	0.53	0.55	0.54	0.5	0.48	0.49	0.55	0.5	0.5	0.55	0.57

	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
24	1										
25	0.7	1									
26	0.7	0.71	1								
27	0.58	0.63	0.72	1							
28	0.65	0.67	0.78	0.78	1						
29	0.54	0.65	0.64	0.66	0.76	1					
30	0.6	0.61	0.58	0.65	0.68	0.71	1				
31	0.64	0.67	0.65	0.69	0.68	0.63	0.68	1			
32	0.67	0.71	0.68	0.63	0.68	0.61	0.65	0.78	1		
33	0.61	0.65	0.64	0.65	0.68	0.61	0.7	0.67	0.78	1	
34	0.67	0.66	0.64	0.64	0.66	0.52	0.62	0.72	0.72	0.67	1
35	0.65	0.66	0.63	0.68	0.62	0.56	0.58	0.65	0.68	0.6	0.65
36	0.64	0.61	0.61	0.71	0.68	0.61	0.61	0.65	0.61	0.63	0.64
37	0.63	0.58	0.58	0.63	0.64	0.63	0.61	0.67	0.6	0.57	0.6
38	0.55	0.58	0.56	0.58	0.62	0.62	0.58	0.59	0.53	0.56	0.65
39	0.63	0.58	0.63	0.61	0.63	0.56	0.59	0.58	0.6	0.56	0.62
40	0.65	0.59	0.68	0.58	0.65	0.55	0.63	0.62	0.68	0.6	0.64
41	0.64	0.68	0.67	0.58	0.61	0.6	0.58	0.64	0.68	0.61	0.69
42	0.69	0.71	0.72	0.63	0.65	0.59	0.63	0.66	0.66	0.58	0.67
43	0.59	0.59	0.6	0.54	0.65	0.6	0.6	0.58	0.62	0.59	0.65
44	0.58	0.6	0.58	0.53	0.6	0.55	0.58	0.57	0.58	0.5	0.57
45	0.57	0.53	0.55	0.53	0.57	0.57	0.6	0.54	0.51	0.51	0.57
46	0.55	0.57	0.55	0.55	0.55	0.54	0.54	0.53	0.55	0.58	0.57
47	0.65	0.65	0.65	0.58	0.64	0.58	0.55	0.64	0.67	0.61	0.64
48	0.58	0.58	0.59	0.54	0.58	0.59	0.59	0.58	0.63	0.59	0.63
49	0.53	0.58	0.56	0.55	0.62	0.6	0.59	0.62	0.66	0.6	0.58
50	0.57	0.54	0.57	0.53	0.64	0.63	0.6	0.55	0.57	0.54	0.57

	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
35	1										
36	0.72	1									
37	0.68	0.77	1								
38	0.63	0.65	0.75	1							
39	0.65	0.65	0.69	0.86	1						
40	0.64	0.71	0.68	0.67	0.76	1					
41	0.59	0.63	0.64	0.65	0.66	0.71	1				
42	0.63	0.65	0.63	0.63	0.61	0.73	0.78	1			
43	0.58	0.6	0.59	0.68	0.67	0.68	0.68	0.71	1		
44	0.59	0.57	0.63	0.62	0.63	0.65	0.64	0.66	0.72	1	
45	0.59	0.57	0.63	0.62	0.6	0.63	0.6	0.62	0.68	0.67	1
46	0.6	0.53	0.58	0.62	0.63	0.63	0.55	0.52	0.58	0.63	0.68
47	0.66	0.58	0.6	0.62	0.6	0.62	0.67	0.65	0.59	0.67	0.67
48	0.58	0.6	0.52	0.51	0.54	0.64	0.63	0.6	0.61	0.58	0.59
49	0.54	0.6	0.6	0.57	0.53	0.68	0.63	0.64	0.61	0.62	0.55
50	0.55	0.6	0.54	0.56	0.49	0.65	0.6	0.6	0.62	0.57	0.55

	46	47	48	49	50
46	1				
47	0.68	1			
48	0.63	0.73	1		
48	0.56	0.66	0.67	1	
50	0.55	0.63	0.65	0.8	1

Foto N°1: Accesiones de haba

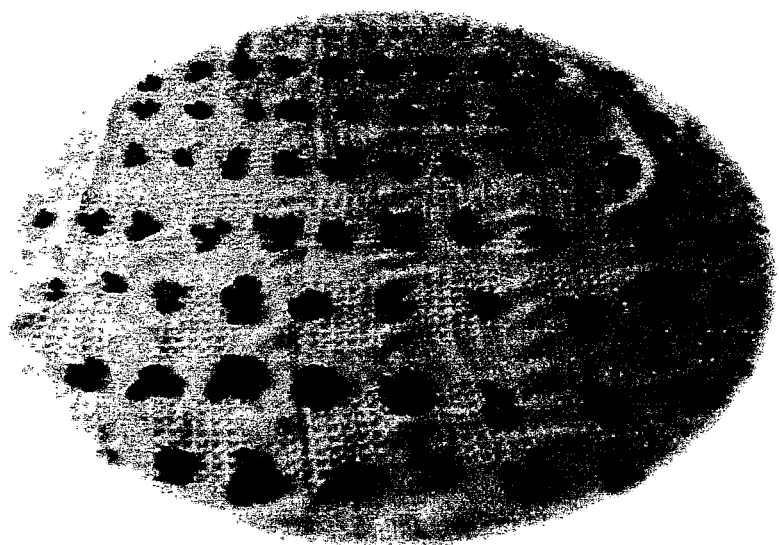


Foto N°2: Escogiendo el material vegetal para la extracción de ADN



Foto N°3: Calidad del ADN de habas

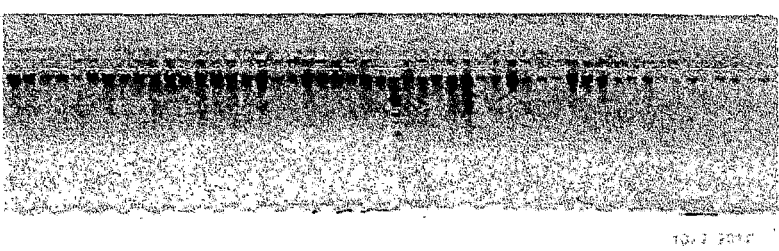


Foto N°4: Trabajando las 50 muestras de haba en el IBT



Foto N°5: Cargando las 50 muestras en una cámara electroforética



Foto N°6: Geles de poliacrilamida y el polimorfismo generado en habas

