

Identificación de marcadores microsatélites asociados a la concentración de Fe y Zn en el grano de la caraota en familias F_{2:3}

Gino Campos Tirado^{1*}, Margaret Gutiérrez¹, Catalina Ramis², Luis Angulo Graterol², Zuleyvi Henríquez¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Centro Nacional de Investigaciones Agropecuaria (CENIAP). Maracay, Aragua, Venezuela. ²Universidad Central de Venezuela (UCV), Facultad de Agronomía (FAGRO). Maracay, Aragua, Venezuela. Correo electrónico: ing.gino.campos@gmail.com

RESUMEN

El incremento de micronutrientes en los granos alimenticios, con técnicas de fitomejoramiento, es una estrategia en la prevención y manejo de las deficiencias de estos en la población mundial. El objetivo de este estudio fue identificar la asociación entre marcadores de tipo microsatélites (SSR) y la concentración de hierro (Fe) y Zinc (Zn), como también la herencia de estos caracteres en caraota. Se evaluaron 77 familias, provenientes de cruces simples de la población IPR-Tiziu//I-2581 en F_{2:3}, con los SSR BM-143, BM-181, BM-183, AG-1, BMd-001 y BMd-028. Se verificó la segregación para cada SSR e identificaron los QTL, por el método un marcador a la vez, con el programa MapDisto; con significación P<0,05, LOD mínimo de 3,0 y r máximo 0,3. Los caracteres mostraron distribución continua, que corresponde a herencia de tipo cuantitativa. Se observaron familias con valores intermedios, mayores y menores que sus parentales, lo que indica una expresión fenotípica transgresiva. Los SSR BM-181, BM-183, BMd-001 y BMd-028 presentaron segregación Mendeliana ¼:½:¼, para las 77 familias evaluadas y los SSR BM143 y AG-1 mostraron distorsión en la segregación. Se detectaron cuatro QTL asociados a la concentración de estos minerales, dos para la concentración de Fe mostrados con los SSR BM-183 (cromosoma 7) con $F = 3,10$ y BMd-001 (cromosoma 3) con $F = 3,56$; y dos QTL para Zn, en los SSR BM-183 y BMd-001, para un F de 3,31 y 3,41 respectivamente. La detección de estos QTL facilita la selección de familias con alto valor nutricional, con miras a la biofortificación del cultivo.

Palabras clave: ADN genómico, fitomejoramiento, QTL, marcadores genéticos, *Phaseolus vulgaris* L.

Identification of microsatellite markers associated Fe and Zn concentration in the grain of the common bean in F_{2:3} families

ABSTRACT

The increase of micronutrients in food grains, with plant breeding techniques is a strategy in the prevention and management of their deficiencies in the world population. The objective of this study was to identify the association between microsatellite markers and the concentration of Fe and Zn, as well as the inheritance of these characters in common bean. A total of 77 families for the F_{2:3} population of the single cross IPR-Tiziu//I-2581 were evaluated; using the SSRs BM-143, BM-181, BM-183, AG-1, BMd-001 and BMd-028. The segregation was verified for each microsatellite and the QTLs were identified by single marker analysis, one at a time, with MapDisto Program, using significance level of P<0,05 corresponded to a minimum LOD of 3,0 and r maximum of 0,3. The characters showed continuous distribution, corresponding to quantitative inheritance; and intermediate families and / or major or minor families are shown, which indicates transgressive phenotypic expression. The SSRs BM-181, BM-183, BMd-001 and BMd-028 had Mendelian segregation ¼:½:¼ and the SSRs BM-143 and AG-1 showed distortion in the segregation. Four QTL associated with Fe and Zn concentration were detected, two for the Fe variable detected in the primers BM-183 (chromosome 7) with $F = 3.10$ and BMd-001 (chromosome 3) with $F = 3.56$; and two QTL for Zn, in the SSRs BM-183 and BMd-001 (chromosome 3), for an F of 3.31 and 3.41 respectively. These QTLs detected, facilitates the selection of lines with high nutritional value, with a view to achieving the biofortification of the crop.

Key words: Genomic DNA, plant breeding, QTL, genetic markers, *Phaseolus vulgaris* L.

Recibido: 20/06/2018 - Aprobado: 20/12/2018

INTRODUCCIÓN

La malnutrición afecta cerca de la tercera parte de la población mundial, con énfasis en mujeres y niños de hogares de escasos recursos. Esto constituye un problema de salud pública en el ámbito global. Las deficiencias de micronutrientes, como el hierro (Fe) y el zinc (Zn), son los más prevalentes y afectan al menos 2.000 millones de personas (OMS 2018). La población con insuficiencia de estos minerales manifiesta un alto índice de anemia, bajo desarrollo cognitivo, retraso en el crecimiento y respuestas negativas en el sistema inmunitario, entre otras afectaciones (Abbaspour *et al.* 2014). Venezuela no escapa de esos problemas con un incremento del número de personas subnutridas, que alcanzó 4,2 millones para el trienio 2014-2016 (FAO 2017).

La baja disponibilidad de alimentos básicos de calidad para la población, conlleva a una deficiencia de micronutrientes, como el Fe y el Zn, esenciales para el desarrollo del individuo. Una de las estrategias para la prevención y manejo de las esas deficiencias, en la dieta de la población humana, es la producción y disponibilidad de cultivos biofortificados. Las metodologías para la obtención de estos cultivos se fundamentan en el incremento de la concentración de nutrientes, con técnicas de fitomejoramiento tradicional y uso de herramientas biotecnológicas (Tofiño-Rivera y Tofiño-Rivera 2013).

La caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) es un rubro importante en los programas de biofortificación de cultivos, porque es una leguminosa de alto consumo alimenticio en la población mundial. Esta constituye una de las mayores fuentes vegetales de Fe, Zn y proteínas en muchos países, principalmente en los continentes de África y América (Izquierdo *et al.* 2018, Tofiño-Rivera *et al.* 2016). En Venezuela, la caraota es uno de los alimentos de la canasta básica, con un consumo per cápita de 6,9 kg.año⁻¹ (FEDEAGRO 2017). Esto la ubica como un rubro estratégico para el desarrollo de un programa de biofortificación, como aporte al déficit nutricional, en el país.

Los valores de referencia para la concentración de Fe en el grano de la caraota varían de 50 a 80 ppm; valores inferiores o igual a 50 ppm se

consideran bajos, mientras que por encima de 80 ppm se consideran biofortificados (Brigide *et al.* 2014, Mukamuhirwa *et al.* 2015). Los valores de Zn varían entre 20 y 36 ppm, por encima de este último se consideran biofortificados. En la mayoría de los cultivares comerciales de caraota el valor de este micronutriente es inferior o igual a 20 ppm (Brigide *et al.* 2014, Mukamuhirwa *et al.* 2015).

Diversos estudios realizados en países consumidores de este rubro, resaltan la importancia de los programas de biofortificación en caraota y la evaluación participativa de líneas avanzadas en diferentes condiciones ambientales. En Zimbabue y Malawi, en el 2010, se liberaron variedades con concentraciones de Fe y Zn superiores a los valores de referencia (Tofiño *et al.* 2011). En México, se liberó la variedad de frijol negro Guanajuato biofortificado, tomando en cuenta variables de rendimiento agronómico y tipo de grano aceptado por los consumidores (Acosta *et al.* 2008). En Panamá, se consideraron criterios agronómicos y nutricionales en la selección de genotipos biofortificados promisorios (Rodríguez *et al.* 2009). En Cuba, se incluyeron criterios de consumo, como color de grano, forma, sabor y tiempo de cocción (Chaveco *et al.* 2006). En Colombia, se desarrollaron pruebas de adaptación de líneas de caraota biofortificadas con alta concentración de micronutrientes (Monserrate 2008).

Venezuela se cataloga como centro de diversidad de caraota, con parte de esta variabilidad en los cultivares locales y nativos de numerosas zonas agroecológicas del país (Gutiérrez y Rincón 2011). Esto representa una ventaja, para la incorporación de genotipos con alto valor nutricional, en los programas de mejoramiento genético, ya sea como parentales o selección directa de genotipos sobresalientes. El país cuenta con un germoplasma de caraota con caracterización nutricional, para los caracteres concentración de Fe y Zn en el grano. En más de 200 cultivares se identificaron genotipos que contienen dos veces más Fe y 40 % más de Zn, que los cultivares comerciales y las líneas avanzadas de los programas de mejoramiento genético existentes (Granito *et al.* 2006, Granito *et al.* 2009, Campos-Tirado 2018).

En los cultivos, la mayoría de las características heredables de importancia económica, como componentes de rendimiento, tolerancia a estrés y calidad nutricional, resultan de la acción conjunta de varios genes.

Poco se sabe del número, posición cromosómica, magnitud del efecto e interacciones de las regiones del ADN que controlan la expresión de la concentración de Fe y Zn en el grano de la caraota (Izquierdo *et al.* 2018). Estas características, son afectadas por el ambiente, que junto con la interacción genotipo-ambiente reducen la eficiencia en la selección de los referidos caracteres.

Las selecciones fenotípicas, por sí solas, no conducen a las ganancias genéticas necesarias para que la biofortificación sea exitosa (Vasconcelos *et al.* 2017). Se requiere de herramientas genómicas, para que los mejoradores alcancen las concentraciones de Fe y Zn objetivo en el grano de la caraota. Una de las técnicas disponibles para esas evaluaciones son los QTL (Quantitative Trait Loci, por sus siglas en inglés), es decir, loci controladores de características cuantitativas. Estos son eficaces en el proceso de selección de genotipos o líneas recombinantes y reducen el tiempo para la obtención de cultivares mejorados en su calidad nutricional (Blair *et al.* 2011, Izquierdo *et al.* 2018).

El desarrollo de cultivares de caraota, con altas concentraciones de Fe y Zn en el grano, por métodos de mejoramiento genético, con apoyo de herramientas biotecnológicas, permite la disponibilidad de alimentos con calidad nutricional. Esto es una alternativa que beneficiaría a las familias venezolanas; en especial, aquellas comunidades de acceso limitado de alimentos con alta calidad nutricional.

El objetivo de la presente investigación fue identificar la asociación entre marcadores microsatélites y la concentración de Fe y Zn en el grano de la caraota en familias $F_{2:3}$ (Tercera generación filiar sin selección); con miras a la biofortificación del cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron 77 familias de caraota en generación $F_{2:3}$ proveniente de una población originada del cruce simple entre los genotipos IPR-Tiziu (I-2909) e I-2581. Ambos genotipos corresponden a accesiones del Banco de Germoplasma de caraota, de la Unidad de Conservación de Recursos Fitogenéticos del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícola (INIA), Centro Nacional de Investigaciones Agropecuaria (CENIAP), Aragua, Venezuela.

IPR-Tiziu, es un cultivar comercial introducido de la República Federativa del Brasil. Se originó en el programa de mejoramiento genético del Instituto Agronómico de Paraná (IAPAR), con validación del Registro Nacional de Cultivares en Rio Grande do Sul y liberado en el 2007; su genealogía es IAPAR-LP91-117/IACUma. El genotipo I-2581 es un cultivar local que se colectó en el estado Táchira, con el código DP-06-06-119. Su nombre común en la zona es "caraota negra criolla capachera". Estos dos genotipos se usaron como parentales por sus contrastes para las concentraciones de Fe y Zn en el grano y sus valores de productividad, descritos por Campos-Tirado (2018). El IPR-Tiziu se caracteriza por una alta concentración Fe y bajo de Zn en el grano e I-2581, por alto en Zn y bajo en Fe. Para la evaluación se usaron los parentales como testigos.

Ubicación de los experimentos

La siembra se realizó en el Lote F-02 del Campo Experimental del INIA-CENIAP. Ubicado a una altura de 455 m.s.n.m., 10°17'14.0"N y 67°36'02.0"O. Durante el ciclo del cultivo, periodo diciembre 2014 - febrero 2015, la precipitación fue de 0,79 mm en promedio quincenal; la humedad relativa promedio de 70 %, con temperatura máxima de 33 °C y mínima de 17 °C. El suelo de textura predominante franco, con 51,8 % de arena, 33 % de limo y 15,2 % de arcilla; con pH de 5,29 y 2,06 % de materia orgánica.

Para el manejo agronómico del cultivo, se realizaron cuatro pases de rastra y, posteriormente, se prepararon surcos de 5 m de largo y 0,75 m entre surco.

En la siembra, se colocaron dos semillas por punto, transcurrido los 12 días se entresacaron para dejar una densidad de 5 plantas por metro lineal. Al momento de la siembra se aplicó fertilizante de fórmula completa 15-15-15, a razón de 300 kg.ha⁻¹ y reabono a los 25 días después de la siembra, con urea en una proporción de 50 kg.ha⁻¹.

Para el control de malezas, se aplicó pendimetalin, como herbicida pre-emergente, en dosis de 3 L.ha⁻¹, al momento de la siembra. Antes de la floración se realizó una limpieza manual.

Para suplir la demanda de agua del cultivo se aplicó riego complementario, con una lámina de agua suficiente para mojar adecuadamente el terreno, cuando fue necesario. Se utilizó equipo de riego por aspersión. La cosecha se realizó por planta individual en la madurez (R9).

Los análisis de concentración de Fe y Zn en el grano, de las familias y los testigos, se realizaron en el Laboratorio General de Suelo-Agua-Planta del Instituto de Edafología de la Universidad Central de Venezuela (UCV), Facultad de Agronomía (FAGRO), Maracay, Aragua. La evaluación molecular se hizo en el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA) de la UCV- FAGRO.

Análisis de la concentración de Fe y Zn en el grano

Se tomaron muestras al azar de 10 semillas por familia y por los testigos. Se lavaron con agua destilada estéril y después se secaron en un horno, a 45 °C durante 2 días (Granito *et al.* 2006). Las muestras crudas se molieron y se obtuvo 1 g del tejido vegetal por genotipo. Para obtener la ceniza, se incineraron a 550 °C por un periodo de 5 horas y se dejó enfriar; se le añadió 5 mL de una mezcla (5:2) de ácido nítrico-ácido clorhídrico, se filtró y se llevó a 15 mL con el ácido. Se determinó el contenido de Fe y Zn por medio de espectroscopía de emisión atómica, a 248 nm para Fe y 213 nm para Zn.

Para las variables concentración de Fe y Zn en el grano, se verificó la normalidad de la distribución de los datos mediante la prueba de Shapiro y Wilks (1965). Se efectuaron los cálculos de estadística descriptiva de las 77 familias F_{2:3}. Se

realizaron histogramas de distribución de frecuencias absolutas. Para los análisis se usó una hoja de Excel (Microsoft) y el programa estadístico InfoStat versión 2017 (Di Rienzo *et al.* 2017).

Análisis molecular

Para la extracción del ADN genómico, se tomaron muestras de semillas de los parentales IPR-Tiziu e I-2581 y las 77 familias F_{2:3}. El tejido se molió y maceró con nitrógeno líquido y se extrajo el ADN, con tampón CTAB (2 %), según la metodología de Gepts y Koinange (1992). Se verificó la integridad y cantidad del ADN en geles de agarosa al 0,8 %, con bromuro de etidio (0,5 mg.mL⁻¹), como agente intercalante entre las bases del ADN. Se utilizó ADN de concentración conocida (Fago Lambda) a 50 y 100 ng.μL⁻¹ para estimar la concentración obtenida. Con base a la información de la concentración, se prepararon concentraciones finales de 2,5 ng.μL⁻¹ de ADN para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). La concentración final de los componentes de la mezcla de reacción de PCR-SSR se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Composición de una reacción PCR (20 μL)

Componente	Concentración
albúmina de suero bovino (BSA)	1mg.mL ⁻¹
tampon Tris-HCl	5X
MgCl ₂	25mM
polimerasa GoTaq®	5U.μL ⁻¹
desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP)	10 mM
ADN molde	2,5 ng.μL ⁻¹
cebadores específicos	25 mM
agua purificada c.s.p. 20 μL	1X

La amplificación se realizó bajo las condiciones del Laboratorio de Genética Molecular del CIBA-UCV descritas por Castañeda *et al.* (2014), con seis marcadores moleculares de tipo microsatélites, que resultaron polimórficos entre los parentales IPR-Tiziu e I-2581 (Cuadro 2). Las condiciones de amplificación de la PCR-SSR se presentan en el Cuadro 3.

La electroforesis se efectuó en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 6 %, en condiciones de 1.301 voltios, 90 vatios y 69 miliamperios por 45 minutos aproximadamente. Los productos de amplificación fueron revelados en solución de nitrato de plata (Castañeda *et al.* 2014). Se realizó el análisis de los alelos para cada una de las 77 familias en F_{2:3} y sus parentales, a partir de las observaciones de los geles para cada uno de los SSR evaluados.

Posteriormente, se elaboró una matriz genotípica en una hoja de cálculo Excel (Microsoft) con los perfiles electroforéticos visualizados en los geles de poliacrilamida; para cada una de las 77 familias en F_{2:3} y cada uno de los SSR. Los homocigotos se le designaron las letras “aa” y “bb” y los heterocigotos “ab”. Se verificó la segregación mendeliana (1:2:1), para cada cebador, con el uso del programa MapDisto v2.0 Beta 104-2010 (Lorieux 2012), a través de la prueba de Bondad

Cuadro 3. Perfil termico de las reacciones PCR

Fase PCR	T (°C)	t (s)	
Desnaturalización	92	180	
34 ciclos	Desnaturalización	92	15
	Hibridación	(45 - 55) específica cebador	60
	Extensión	72	15
Extensión Final	72	300	

de Ajuste Ji- cuadrado (X^2) con una probabilidad $P < 0,05$. Luego de verificar la segregación mendeliana y dependiendo del número de SSR polimórficos, se determinaron los grupos de ligamientos entre los SSR; finalmente, la asociación entre los SSR y la concentración de Fe y Zn en el grano de la caraota, con los parámetros *LOD* mínimo de 3.0 y un *r* máximo 0,3.

Para estos QTL se utilizó la función de Kosambi y el método de mapeo simple (Zeng 1994). Se usaron los valores cuantitativos de los caracteres

Cuadro 2. Marcadores moleculares tipo microsatélites (SSRs) polimórfico entre los parentales IPR-Tiziu e I-2581 y utilizados para la evaluación de las 77 familias F_{2:3}.

SSRs (locus)	C	Motivo	Directo / Reverso
BM-143	2	(GA) ₃₅	GGGAAATGAACAGAGGAAA / ATGTTGGGAACCTTTTAGTGTG
BM-181	3	(CT) ₁₇	ATGCTGCGAGTTAATGATCG / TGAGGAGCAAACAGATGAGG
AG1	3	(GA) ₈ GGTA(GA) ₅ GGGGACG(AG) ₄	CATGCAGAGGAAGCAGAGTG / GAGCGTCGTCGTTTCGAT
BM-d001	3	(AT) ₉	CAAATCGCAACACCTCACAA / GTCGGAGCCATCATCTGTTT
BMd-028	5	(GT) ₄	TGCATCAACTTTAGGAGCTTG / TCTTGTCTTATCAGCAGGTGGA
BM183	7	(TC) ₁₄	CTCAAATCTATTTACTGGTCAGC / TCTTACAGCCTTGCAGACATC

Fuente: Blair *et al.* (2010) y Blair *et al.* (2011)

evaluados y el genotipo para cada marcador microsatélites. Se consideró la existencia de un QTL, si el valor fenotipo de una variable es asociada con el locus de un marcador, para un *LOD Score* > 3.0. El método *LOD Score*, es el logaritmo en base 10 de la razón entre el valor de la función de máxima verosimilitud para r y el valor de la función para segregación independiente (Morton 1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de la concentración de Fe y Zn en el grano

Para los valores de la concentración de Fe y Zn en el grano de la caraota, se observó asimetría positiva y curtosis negativas (Cuadro 4). Esto señala que la mayor parte de las familias se orientan hacia los parentales de baja concentración de estos dos minerales. Se muestra un coeficiente de variación alto, para la concentración de Fe y Zn, de 30,65 % y 33,97 %, respectivamente. Eso indica, una alta variabilidad entre las familias para estos caracteres, con rangos de 10,5 mg.kg⁻¹ a 169,8 mg.kg⁻¹ de Fe y 10,3 mg.kg⁻¹ a 89,7 mg.kg⁻¹ de Zn. Esos valores se ubican dentro de los esperados, con base a investigaciones realizadas en poblaciones de caraota (Blair *et al.* 2013, Teixeira *et al.* 2015).

Los valores de la concentración de Fe y Zn en el grano, para las 77 familias evaluadas, mostraron variación continua (Figura 1), con una distribución normal en ambas variables. Esto corresponde a una herencia de tipo cuantitativa, de caracteres poligénicos (Blair *et al.* 2013, Teixeira *et al.* 2015). Se muestran familias con valores intermedios y familias con valores mayores o menores, que los

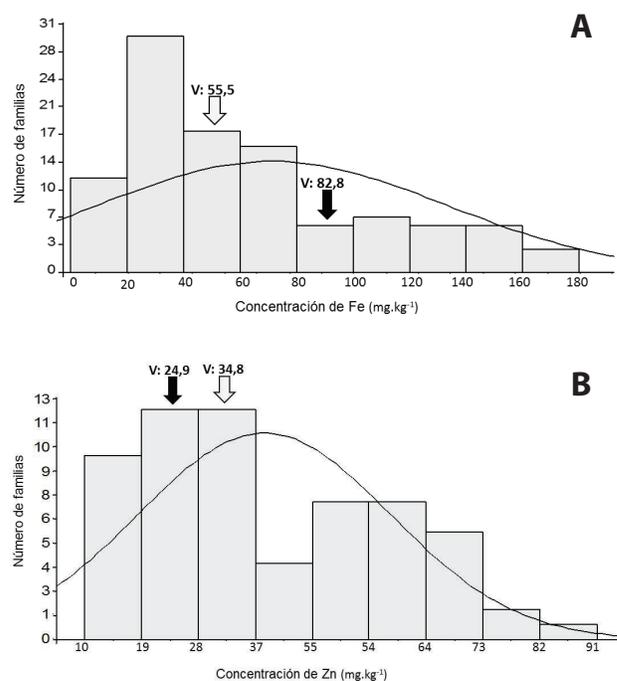


Figura 1. Distribución fenotípica de la concentración de Fe (A) y Zn (B) de familias en F_{2:3} del cruce IPR-Tiziu/I-2581. La flecha negra indica la ubicación de la media del cultivar IPR-Tiziu y la blanca del cultivar I-2581. V: valor promedio del carácter evaluado para los parentales.

parentales, lo que indica una expresión fenotípica transgresiva. El 31 % de las familias superan al parental con alto contenido de Fe y 34 % superior al parental con alto contenido de Zn. Esto demuestra que en la población se encuentra una proporción de individuos disponibles para el proceso de selección de genotipos, de alto valor nutricional, bajo un esquema de mejoramiento genético (Blair *et al.* 2013, Teixeira *et al.* 2015).

Cuadro 4. Medias y otros estadísticos descriptivos del contenido de Fe y Zn en el grano en las 77 familias F_{2:3} y los parentales: IPR-Tiziu e I-2581.

Variable	n	Media	S	CV	Valor mínimo	Valor máximo	Asimetría	Kurtosis
Fe (mg/kg)	77	65,12	19,96	30,65	10,5	169,8	0,88	-0,68
Zn (mg/kg)	77	31,98	10,86	33,97	10,3	89,7	0,72	-0,89

Hierro (Fe), Zinc (Zn), desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV)

Los resultados de este estudio concuerdan con reportes de Blair *et al.* (2010, 2011) para las concentraciones de Fe y Zn en el grano en líneas recombinantes, provenientes de las poblaciones G14519//G4825 y G21242//G21078. Los autores observaron en la primera población, rangos de 35,4 mg.kg⁻¹ a 97,1 mg.kg⁻¹ de Fe y 16,6 mg.kg⁻¹ a 49,5 mg.kg⁻¹ de Zn; en la segunda población, rangos entre 28 mg.kg⁻¹ a 95,1mg.kg⁻¹ de Fe y 16,9 mg.kg⁻¹ a 37 mg.kg⁻¹ de Zn. Posteriormente, Blair *et al.* (2013) obtuvieron rangos de 20 mg.kg⁻¹ a 263 mg.kg⁻¹ de Fe y 17 mg.kg⁻¹ a 54,5 mg.kg⁻¹ de Zn, en grano de caraota, de 138 líneas recombinantes provenientes de la población Cerinza// (Cerinza//Cerinza/G10033). Todo eso coincide con variaciones continuas de las concentraciones de Fe y Zn en el grano de la caraota, en las líneas recombinantes de las diferentes poblaciones evaluadas, provenientes de parentales contrastantes para estos caracteres.

Zemolin *et al.* (2016) obtuvieron patrones diferenciados y continuos en la concentración de estos minerales, en el grano de recombinantes, de las poblaciones IAC-Boreal//Light-Red-Kidney y Ouro-Branco//Light-Red-Kidney. Esas poblaciones provenientes de cruces controlados entre genotipos contrastantes de caraota. Los rangos de Zn que observaron, van desde 10,75 mg.kg⁻¹ a 37,5 mg.kg⁻¹ y de Fe de 24,75 mg.kg⁻¹ a 102,4 mg.kg⁻¹ en generación F₂.

Análisis molecular

Para la prueba de bondad de ajuste, Ji- cuadrado (X²), los SSR BM-181, BM-183, BMd-001 y BMd-028 presentaron la segregación esperada (1:2:1), sin rechazo de la hipótesis nula. La segregación de las familias F_{2:3} corresponde a las proporciones mendelianas 1/4:1/2:1/4. Mientras que, los SSR BM-143 y AG-1 presentaron una distorsión respecto a la segregación 1/4:1/2:1/4 y se rechazó la hipótesis nula. De los dos SSR que no siguieron la segregación esperada, BM-143 resultó significativo para P<0,05 y AG-1 altamente significativo para P<0,05. En ambos casos, se favoreció los alelos del parental IPR-Tiziu (Cuadro 5).

La tasa de distorsión se puede relacionar con diversas causas, como desviaciones estadísticas, errores en el genotipado de la población segregante o la no amplificación del total de los individuos por error en la PCR (Semagn *et al.* 2006). Otros autores, hacen referencia que la distorsión se debe al incremento en la divergencia genética entre los parentales, irregularidades meióticas en la transmisión de los factores genéticos, selección gamética o cigótica y apareamiento preferencial entre genomas homólogos (Nybom *et al.* 2004).

También, factores biológicos como selección natural durante la fertilización, crecimiento de la planta, gametogénesis y desarrollo de semillas, pueden ocasionar distorsión en la segregación

Cuadro 5. Evaluación de la segregación esperada (1/4:1/2:1/4) para cada microsatélite (SSR) en las familias F_{2:3}.

SSR (locus)	N	aa	ab	bb	X ² 1/4:1/2:1/4	P
BM-143	33	15	13	5	7,55	0,02299*
BM-181	51	10	31	10	2,37	0,30536 ns
BM-183	59	10	30	19	2,76	0,25124 ns
AG1	55	6	16	33	36,13	0,00000***
BMd001	49	9	23	17	2,80	0,24710 ns
BMd028	59	10	31	18	2,32	0,31317 ns

Homocigotos a (aa), homocigotos b (bb), heterocigotos (ab). P<0,05.

(Garris *et al.* 2003). El tipo de cruzamiento y parentales es un factor de gran importancia, sobre todo cuando se involucra en la cruce de un materiales locales o silvestres (Blair *et al.* 2006).

De los cuatro SSR evaluados que presentaron segregación esperada, sólo en dos se detectó asociación con los caracteres concentración de Fe y Zn, en el grano de la caraota, para un $LOD\ Score > 3.0$. En el Cuadro 6, se observa la asociación significativa entre los SSR BM-183 (Cromosoma 7) y BMd-001 (Cromosoma 3) con las variables concentración de Fe y Zn en el grano de la caraota. Estos resultados coinciden con estudios anteriores, donde se han identificado QTL asociados a las concentraciones de Fe y Zn en el grano de la caraota (Pérez-Vega *et al.* 2010).

Blair *et al.* (2010) evaluaron 110 líneas recombinantes de la población G14519//G4825 y detectaron QTL en los grupos de ligamiento b02; b03; b04; b07; b08 y b11, asociados a la concentración de Fe y Zn en el grano. Esto, a partir de marcadores moleculares de tipo SSR y RAPD. Posteriormente, Blair *et al.* (2011) detectaron nueve QTL para la concentración de estos minerales en el grano, con marcadores moleculares de tipo SSR y RAPD, en una población (G21242//G21078) de 100 líneas recombinantes.

Blair *et al.* (2013) analizaron la asociación de los SSR con la concentración de Fe y Zn en el grano de 138 líneas recombinantes de caraota,

provenientes de la población Cerinza//Cerinza//Cerinza/G10033), donde detectaron 7 QTL en los grupos de ligamientos b01; b02; b07 y b11.

Los caracteres cuantitativos son un desafío en el fitomejoramiento, por la complejidad genética que los rigen y la dificultad de apilar numerosos alelos que los controlan. Entre estos, la concentración de Fe y Zn en el grano de la caraota (Izquierdo *et al.* 2018). A pesar de esa amplia variabilidad y el efecto ambiental, el componente genético resulta importante para el incremento de la concentración de esos dos minerales en el grano de la caraota (Izquierdo *et al.* 2018).

Existe una correlación positiva demostrada, para el incremento simultaneo de las concentraciones de Fe y Zn en el grano de la caraota (Teixeira *et al.* 2015, Zemolin *et al.* 2016, Izquierdo *et al.* 2018); que puede estar relacionada con el movimiento similar del Fe y Zn a través de la planta, porque varios de los mismos genes están involucrados en el transporte de estos dos minerales (Izquierdo *et al.* 2018).

Lo antes descrito, es la importancia de detectar la asociación de regiones del ADN con la concentración de Fe y Zn en el grano. Los QTL detectados, en el presente estudio, facilitarán la identificación de familias en generación $F_{2:3}$, que porten alelos favorables para la alta concentración de estos minerales en el grano de la caraota. Esto garantiza un proceso de selección más eficiente, al reducir el número de familias que avanzarán en cada ciclo de ese proceso; se disminuirá el tiempo para el desarrollo de líneas con alto valor nutricional, para la obtención de cultivares biofortificados.

CONCLUSIONES

Se reconoce la herencia de tipo cuantitativa y una expresión fenotípica transgresiva, para los caracteres de concentraciones de Fe y Zn, en el grano de la caraota de 77 familias en $F_{2:3}$. Por la distribución continua, de la concentración de ambos minerales, y la obtención de familias con valores intermedios, valores mayores y menores, que los parentales.

Cuadro 4. Valores de la prueba de F para los QTL putativos relacionados a componentes de rendimiento y contenido de Fe y Zn en el grano en las familias $F_{2:3}$.

SSR (locus)	Fe (mg.kg ⁻¹)	Zn (mg.kg ⁻¹)
BM-181	0,23	0,13
BM-183	3,10*	3,31*
BMd-001	3,56*	3,41*
BMd-28	1,22	1,41

Asociación significativa (*), Hierro (Fe) y Zinc (Zn).

Se identificó la asociación entre los SSR BM-183 y BMD-001 y la alta concentración de Fe y Zn, en el grano de la caraota, en las 77 familias en F_{2:3} del cruce entre los genotipos contrastante IPR-Tiziu e I-2581. Estos QTL asociados a la concentración de Fe y Zn, facilita la selección de líneas con alto valor nutricional, con miras a la obtención de cultivares biofortificados.

LITERATURA CITADA

- Acosta, G; Mendoza, F; Aguilar, B; Esquivel, G; Rodríguez, R; Guzmán, S. 2008. Negro Guanajuato, nueva variedad de frijol para el centro de México. *Revista Agricultura Técnica en México* 34:107-111.
- Abbaspour, N; Hurrell, R; Kelishadi, R. 2014. Review on iron and its importance for human health. *Journal of Research in Medical Sciences* 19(2):164-174.
- Blair, M; Izquierdo, P; Astudillo, C; Grusak, M. 2013. A legume biofortification quandary: variability and genetic control of seed coat micronutrient accumulation in common beans. *Frontiers in Plant Science. Plant Physiology* 4:14 p.
- Blair, M; Astudillo, C; Rengifo, J; Beebe, S; Graham, R. 2011. QTL analyses for seed iron and zinc concentrations in an intra-gene pool population of Andean common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 122(3): 511-521.
- Blair, M; Medina, J; Astudillo, C; Rengifo, J; Beebe, S; Machado, G; Graham, R. 2010. QTL for seed iron and zinc concentration and content in a Mesoamerican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) population. *Theoretical and Applied Genetics*. 121(6): 1059-1070.
- Blair, M; Iriarte, G; Beebe, S. 2006. QTL analysis of yield traits in an advanced backcross population derived from a cultivated Andean wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cross. *Theoretical Applied Genetics* 112: 1149-1169.
- Brigide, P; Canniatt-Brazaca, S; Silva, M. 2014. Nutritional characteristics of biofortified common beans. *Food Science Technology* 34(3):493-500.
- Campos-Tirado, GL. 2018. Asociación entre marcadores microsatélites y la concentración de Fe y Zn en el grano de la caraota (*Phaseolus vulgaris* L.), con miras a la biofortificación del cultivo. Tesis de doctorado. Maracay, Venezuela, INIA-ESAT. 114 p.
- Castañeda, R; Ramis, C; Pérez, D. 2014. Asociación entre marcadores microsatélites y el gen de resistencia a la bacteriosis común en familias F_{2:4} de *Phaseolus vulgaris* L. *Agronomía Tropical* 64(3-4):133-141.
- Chaveco, O; Padrón, M; Permuy, N; Ruiz, B; Pachon, H; Beebe, S; Selva, L. 2006. Biofortificación del frijol común con hierro y zinc una alternativa en la estrategia de diversificación alimentaria en Cuba (en línea). *Agrosalud*. Consultado 10 feb. 2016. Disponible en <https://bit.ly/2YIZ5yM>.
- Di Rienzo, J; Casanoves, F; Balzarini, M; González, L; Tablada, M; Robledo, C. 2017. InfoStat versión 2017, Grupo InfoStat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en <https://bit.ly/3j4Haol>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Italia). 2017. Iniciativa de América Latina y Caribe sin hambre (en línea). Consultado 20 feb. 2017. Disponible en <https://bit.ly/31jdrSH>
- FEDEAGRO (Confederación de Asociaciones de Productores Agropecuarios, Venezuela). 2017. (en línea). Consultado 25 ene. 2018. Disponible en <https://bit.ly/31kvNTf>.
- Garris, A; Mccouch, S; Kresovich, S. 2003. Population structure and its effect on haplotype diversity and linkage disequilibrium surrounding the xa5 locus of rice (*Oryza sativa* L.). *Genetics* 165:759-769.
- Gepts, P; Koinange, E. 1992. Hybrid Weakness in Wild *Phaseolus vulgaris* L. *The Journal of Heredity* 83(2):135-139.
- Granito, M; Guinand, J; Pérez, D; Pérez, S. 2009. Valor nutricional y propiedades funcionales de *Phaseolus vulgaris* L. procesada: un ingrediente potencial para alimentos. *Interciencia* 34(01):64-70.

- Granito, M; Pérez, D; Guinand, J. 2006. Composición química y nutricional de variedades de (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en Venezuela. *Agronomía Tropical* 56(4):513-522.
- Gutiérrez, M; Rincón, C. 2011. Caracterización de la variabilidad genética mediante el uso de marcadores RAPDs, de un grupo de genotipos nativos y comerciales de caraota en Venezuela. *Agronomía Tropical* 61(1):73-83.
- Izquierdo, P; Astudillo, C; Blair, M; Iqbal, A; Raatz, B; Cichy, K. 2018. Meta-QTL analysis of seed iron and zinc concentration and content in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 131:1645-1658.
- Lorieux, M. 2012. MapDisto. Fast and efficient computation of genetic linkage map. *Molecular Breeding* 30:1231-1235.
- Monserate, F. 2008. Análisis del proceso de biofortificación de variedades de frijol Andino de tipo comercial calima en Colombia (en línea). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Consultado 17 abr. 2017. Disponible en <https://bit.ly/3aOJl6Y>
- Morton, NE. 1995. LODs past and present. *Genetics* 140:7-12.
- Mukamuhirwa, F; Tusiime, G; Mukankusi, M. 2015. Inheritance of high iron and zinc concentration in selected bean varieties. *Euphytica* 205(2):349-360. <https://bit.ly/3ho8bT7>
- Nybom, H; Esselink, G; Werlemark, G; Vosman, B. 2004. Microsatellite DNA marker inheritance indicates preferential pairing between two highly homologous genomes in polyploidy and hemisexual dog-roses, Rosa L. Sect. Caninae DC. *Heredity* 92:139-150.
- OMS (Organización Mundial de la Salud, Suiza). 2018. Nutrición (en línea). Consultado 25 sep. 2018. Disponible en <https://bit.ly/2YoxZHm>
- Pérez-Vega, E; Pañeda, A; Rodríguez, C; Campa, A; Giraldez, R; Ferreira, J. 2010. Mapping of QTL for morpho-agronomic and seed quality traits in a RIL Population of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 120:136-138.
- Rodríguez, E; Lorenzo, E; Melgar, A; Palacios, E; Gonzales, F; Quintero, A. 2009. Biofortificación del frijol común en Panamá con micronutrientes (en línea). En: Seminario de Biofortificación en Panamá. Consultado 02 mar. 2018. Disponible en <https://bit.ly/32dX5tR>
- Semagn, K; Bjornstad, A; Ndjiondjop, N. 2006. An review of molecular markers methods for plant. *African Journal of Biotechnology* 5(25):2540-2568.
- Shapiro, S; M. Wilk. 1965. An analysis of variance test for normality. *Biometrika* 52(3-4):591-611.
- Teixeira, R; Lima, D; Abreu, A; Ramalho, M. 2015. Implications of early selection for grain colour on iron and zinc content and productivity of common bean. *Plant Breeding*. 134:193-196.
- Tofiño-Rivera, A; Pastrana-Vargas, I; Melo-Ríos, A; Beebe, S; Tofiño-Rivera, R. 2016. Rendimiento, estabilidad fenotípica y contenido de micronutrientes de frijol biofortificado en el Caribe seco colombiano. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 17(3):309-329.
- Tofiño-Rivera, A; Tofiño-Rivera, R. 2013. Contribución de variedades biofortificadas a la seguridad alimentaria. Saarbrücken, Alemania: Editorial Académica Española. 84 p.
- Tofiño-Rivera, A; Tofiño-Rivera, R; Cabal, D; Melo, A; Camarillo, W; Pachón, H. 2011. Evaluación sensorial de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) mejorado nutricionalmente en el norte del departamento del Cesar, Colombia. *Perspectiva en Nutrición Humana* 13(2):60-71.
- Vasconcellos, R; Oraguzie, O; Soler, A; Arkwazee, H; Myers, J; Ferreira, J; Song, Q; McClean, P; Miklas, P. 2017. Meta-QTL for resistance to white mold in common bean. *PLoS ONE*. 12: e0171685.
- Zemolin, A; Ribeiro, N; Casagrande, C; Da Silva, M; Arns, F. 2016. Genetic parameters of iron and zinc concentrations in Andean common bean seeds. *Acta Scientiarum. Agronomy* 38(4):439-446.
- Zeng, Z. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*.136: 1457-1468.