Caracterización Genética y Fenotípica de Accesiones de Germoplasma de Frijol Común de El Salvador y Honduras

Cristina del Carmen López Ramos
María José Cunguán Cundar

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Octubre, 2014

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Caracterización Genética y Fenotípica de Accesiones de Germoplasma de Frijol Común de El Salvador y Honduras

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Cristina del Carmen López Ramos
María José Cunguán Cundar

Zamorano, Honduras
Octubre, 2014

Caracterización Genética y Fenotípica de Accesiones de Germoplasma de Frijol Común de El Salvador y Honduras

Cristina del Carmen López Ramos
María José Cunguán Cundar

Resumen. El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es el segundo grano básico más consumido en El Salvador y Honduras. El mejoramiento de la resistencia a factores bióticos y abióticos se fundamenta en la disponibilidad de genes deseables que pueden encontrarse en la diversidad genética del cultivo. El Programa de Investigaciones en Frijol de Zamorano y el CENTA de El Salvador, cuentan con una amplia colección de accesiones de frijol común, cuya diversidad genética representa un potencial como recurso genético. La diversidad genética de los cultivos puede ser evaluada a través de técnicas moleculares para identificar diferencias genéticas y mediante las características fenotípicas. En el presente estudio se caracterizaron 97 accesiones de frijol común de El Salvador y Honduras en Zamorano, Honduras. En la caracterización molecular se utilizó 22 cebadores con la técnica RAPD (amplificación al azar de polimorfismos de ADN), generándose 225 bandas polimórficas. El análisis de correspondencia usando el coeficiente de Dice (1945) y el dendrograma, indicaron la separación de las accesiones en dos conglomerados que representan a cada uno de los germoplasmas. Dentro de cada conglomerado se observaron otras agrupaciones que sugieren diferentes niveles de similaridad genética. Se encontró una gran variabilidad para la mayoría de características fenotípicas evaluadas incluyendo días a floración y madurez fisiológica, hábitos de crecimiento, color de la flor y de la semilla, y en el rendimiento *per se* y sus componentes número de vainas por planta, número de semillas por vaina y peso seco de 100 semillas.

Palabras clave: ADN, diversidad genética, marcadores RAPD, *Phaseolus vulgaris* L.

Abstract: Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) the second most consumed staple grain in El Salvador and Honduras. Breeding for the improvement of the resistance to biotic and abiotic factors is founded on the availability of desirable genes that can be found in the genetic diversity of the crop. The Bean Research Program of Zamorano and CENTA from El Salvador maintain a wide collection of common bean accessions which represent a potential genetic resource. The genetic diversity of crops can be evaluated using molecular markers to identify genetic distances and with phenotypic characteristics. In this study 97 common bean accessions from El Salvador and Honduras were characterized in Zamorano, Honduras. The molecular characterization utilized 22 molecular RAPD (random amplified polymorphic DNA) markers, generating 225 polymorphic bands. The correspondence analysis and dendogram indicated the separation of the accessions on two clusters representing the two germplasms. Within each cluster Other clusters were observed suggesting different levels of genetic similarities. A great variability was found in the majority of the phenotypic traits evaluated including days to flowering and physiological maturity, growth habits, flower and seed coat colors, seed yield *per se* and the yield components number of pods per plant, seed per pod and 100 seed weight.

CONTENIDO

Portadilla.....i
Página de firmas.....ii
Resumen.....iii
Contenido.....v
Índice de cuadros, figuras y anexos.....vi

1 INTRODUCCIÓN..... 1
2 MATERIALES Y MÉTODOS..... 3
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 8
4 CONCLUSIONES……...16
5 RECOMENDACIONES..... 17
6 LITERATURA CITADA..... 19
7 ANEXOS…….....20

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros Página

1. Accesiones de germoplasma de frijol común de El Salvador y Honduras usados en la caracterización genética y fenotípica. 3
2. Primers usados para el análisis con RAPD de 94 accesiones criollas y tres variedades mejoradas de frijol común de El Salvador y Honduras. 4
3. Perfil térmico para la PCR con marcadores moleculares RAPD.....4
4. Escala para evaluar los hábitos de crecimiento de las accesiones de frijol común de El Salvador y Honduras. 6
5. Resumen estadístico de las características fenotípicas cuantitativas evaluadas en 97 accesiones de frijol común de El Salvador y Honduras. 13

Figuras Página

1. Gel de electroforesis del marcador RAPD OPC-04 mostrando la escalera molecular (EM) y las bandas o polimorfismos de ADN generados en 25 accesiones de frijol común de El Salvador. Zamorano, Honduras, 2014. 8
2. Dendrograma de las similitudes genéticas de 94 accesiones de los germoplasmas de frijol común de El Salvador (grupos S1 y S2) y Honduras (grupos F1 y F2) y variedades mejoradas (grupo M) según el Coeficiente de Dice. 9
3. Dendrograma de las similitudes genéticas de 44 accesiones criollas de frijol común de Honduras según el Coeficiente de Dice. 11
4. Dendrograma de las similitudes genéticas de 50 accesiones criollas de frijol común de El Salvador y tres variedades mejoradas según el Coeficiente de Dice. 11
5. Color de la flor de las accesiones criollas de El Salvador. Foto proporcionadas por el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA), El Salvador. 13
6. Distribución de la frecuencia de días a floración de las 97 accesiones de frijol común de El Salvador y Honduras. 14
7. Distribución de la frecuencia de días a madurez fisiológica de las 97 accesiones de frijol común de El Salvador y Honduras. 14
8. Distribución de la frecuencia del número de vainas por planta de las 96 accesiones de frijol común de El Salvador y Honduras. 15
9. Distribución de la frecuencia de número de semillas por vaina de las 96 accesiones de frijol común de El Salvador y Honduras. 15
10. Distribución de la frecuencia de rendimiento (g/p) de 96 accesiones de frijol común de El Salvador y Honduras. 16

11. Variaciones en el color de grano de las 97 accesiones de El Salvador y Honduras. 16

Anexos Página

1. Accesiones de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.*)* del Banco de Germoplasma "Enrique Álvarez Córdova" del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) de El Salvador y del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF), Zamorano, Honduras. 21
2. Extracción de ADN para el análisis RAPD por el método de la Universidad de Wisconsin (UW)-Madison, adaptado por Laboratorio de Biotecnología Aplicada de Zamorano. 26
3. Cuantificación de ADN para el análisis RAPD usando Quantus™ Fluorometer, adaptado por el Laboratorio de Biotecnología Aplicada de Zamorano. 27
4. Características morfológicas de las accesiones de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.*)* del Banco de Germoplasma "Enrique Álvarez Córdova" del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) de El Salvador y del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF), Zamorano, Honduras 28
5. Aplicaciones de productos agrícolas para el control de malezas, plagas y enfermedades en la parcela de la caracterización fenotípica de las accesiones de El Salvador y Honduras. 33
6. Escala de evaluación para describir el hábito de crecimiento (CIAT 1993) 33

1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de la población de Centro América se caracteriza por ser consumidora de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), por ello este es el segundo grano más consumido de la canasta básica y un componente importante de la alimentación diaria. El frijol es un grano de gran importancia nutricional (aprox. 22 % de proteína) y económica para el desarrollo de los países Centroamericanos, especialmente para salvadoreños y hondureños que exportan a Estados Unidos granos y productos nostálgicos elaborados a base de maíz y frijol (IICA-Proyecto Red SICTA 2007).

La gran diversidad de formas, colores, tamaños y cualidades culinarias de los granos de frijol, permite la elaboración de una gran variedad de recetas. Un porcentaje importante de las poblaciones rurales en América Latina y África dependen de este cultivo para su sustento diario; por ello, los niveles de autoconsumo de este grano son bastante altos en estas regiones (Guachambala 2010). En El Salvador, todavía muchos agricultores usan variedades criollas susceptibles a plagas y enfermedades, las que les ocasionan una reducción en el rendimiento del cultivo. Esta baja en rendimiento en variedades susceptibles conlleva a que este sea inferior a lo reportado cuando se usan variedades mejoradas y un manejo eficiente del cultivo (CENTA 2011).

La diversidad genética de los cultivos puede ser evaluada a través de la variabilidad morfológica, agronómica y molecular. Esta última consiste en usar marcadores moleculares de ADN para analizar la variabilidad genética en cultivos de gran importancia como el frijol (Kumar *et al.* 2009).

Los marcadores moleculares relacionados a una característica específica son de particular interés porque permiten identificar las variedades que poseen los genes responsables de esa característica y diferenciarlos entre sí, es decir, brindar información sobre la diversidad genética (Velasco 2005). El empleo de marcadores moleculares ha significado un gran adelanto en la generación de mapas genéticos, los cuales brindan información sobre la caracterización genética. Debido a esto, el uso de marcadores moleculares se considera una de las 10 tecnologías de mayor impacto en la primera década del siglo XXI (FAO 2010).

Un elemento que no puede ser reemplazado en el mejoramiento genético es la selección de genotipos poco frecuentes con características nuevas o mejoradas (Sorrells 2007). Esto hace referencia a que la caracterización fenotípica de los cultivares continuará siendo uno de los pilares del fitomejoramiento.

El objetivo del presente estudio es caracterizar la diversidad genética de accesiones de germoplasma de frijol común procedente de El Salvador y Honduras utilizando

marcadores moleculares y características fenotípicas, para fines de conservación y uso de estos recursos fitogenéticos en programas de mejoramiento genético del cultivo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Material experimental. Se utilizaron un total de 97 accesiones de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), 44 accesiones provienen del germoplasma criollo de Honduras, 50 de El Salvador, y tres variedades mejoradas cultivadas en ambos países (Anexo 1). Estas accesiones son colecciones núcleo del germoplasma de Honduras (Rosas 2004) y El Salvador (CENTA 2012). Las colecciones núcleos fueron conformadas con base en la ubicación geográfica y altitud de las localidades de recolección, para tener accesiones representativas de las regiones productoras de frijol de cada país incluyéndose accesiones de varios departamentos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Accesiones de germoplasma de frijol común de El Salvador y Honduras usados en la caracterización genética y fenotípica.

Departamentos de Honduras	N° de accesiones criollas	Departamentos de El Salvador	N° de accesiones criollas
Yoro	4	Sonsonate	9
Valle	3	La Paz	2
Sta. Bárbara	4	San Vicente	6
Olancho	4	Cabañas	2
Ocotepeque	3	Santa Ana	6
Lempira	4	La Unión	3
Fco. Morazán	4	San Miguel	1
El Paraíso	3	La Libertad	3
Copán	3	Cuscatlán	2
Intibucá	3	Chalatenango	1
Comayagua	2	Ahuachapán	15
Choluteca	4		
Atlántida	3		
Variedades Mejoradas			
Amadeus 77		CENTA San Andrés	
Tío Canela 75		CENTA 2000	
DEORHO		CENTA Nahuat	

Caracterización genética con marcadores RAPD

Siembra. La siembra de las 97 accesiones de frijol para el análisis molecular se realizó en los invernaderos del Programa de Investigación en Frijol (PIF) en Zamorano. A los 20

días después de la siembra (DDS), se procedió a la recolección de las muestras de tejido foliar para la extracción de ADN de las diferentes accesiones.

Extracción y procesamiento de ADN. Se realizó la extracción, cuantificación, dilución, amplificación y separación de ADN, según los protocolos del método de extracción de ADN para el análisis de RAPD adoptado por el Laboratorio de Biotecnología Aplicada de Zamorano (Anexo 2 y 3).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A las muestras de ADN de cada accesión de frijol común se les adicionó los siguientes reactivos: 3,4 µl de H2O, 1,5 µl buffer verde 5X de PCR con MgCl2 (2 mM), 1,5 µl de dNTP (4 mM), 0,6 µl del primer (10 µg/ml), 0,5 µl de Taq Polimerasa GoTaq® Flexi DNA Polymerase de Promega (5 u/µl) y 7,5 µl de ADN (10 ng/ml), para un total de 15 µl por reacción. Para poder identificar los polimorfismos de ADN en las 97 accesiones estudiadas se utilizaron 22 primers siguiendo el perfil térmico para la PCR (Cuadro 2 y 3).

Cuadro 2. Primers usados para el análisis con RAPD de 94 accesiones criollas y tres variedades mejoradas de frijol común de El Salvador y Honduras.

N°	Primer	Secuencia	N°	Primer	Secuencia
1	OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'	**12**	OPO-05	CCCAGTCACT
2	OPB-10	5'-CTGCTGGGAC-3'	**13**	OPI-16	TCTCCGCCCT
3	OPB-15	GGAGGGTGTT	**14**	OPH-04	GGAAGTCGCC
4	OPC-04	CCGCATCTAC	**15**	OPH-20	GGGAGACATC
5	OPC-11	AAAGCTGCGG	**16**	OPO-13	GTCAGAGTCC
6	OPD-08	GTGTGCCCCA	**17**	OPO-19	GGTGCACGTT
7	OPF-13	GGCTGCAGAA	**18**	OPP-09	GTGGTCCGCA
8	OPG-03	GAGCCCTCCA	**19**	OPQ-09	GGCTAACCGA
9	OPG-05	CTGAGACGGA	**20**	OPQ-14	GGACGCTTCA
10	OPG-06	GTGCCTAACC	**21**	OPR-02	CACAGCTGCC
11	OPG-08	TCACGTCCAC	**22**	OPT-07	CCTCTCGACA

Cuadro 3. Perfil térmico para la PCR con marcadores moleculares RAPD.

Perfil térmico	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	1 min	35
Desnaturalización	94	45 s	35
Acoplamiento	35	30 s	35
Extensión	72	1 min 15 s	35
Extensión Final	72	5 min	1
Mantenimiento	15	∞	

Electroforesis. La electroforesis es una técnica de visualización de ADN para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico a través de una matriz porosa, la cual finalmente las separa por tamaños moleculares y carga eléctrica. Los productos obtenidos de la PCR fueron observados en geles al 1.2% de agarosa en una solución tampón TE 0.5X (Tris-HCl, pH 7.5; ácido bórico, EDTA) en pozos para electroforesis. Las bandas fueron separadas a 110 Voltios durante 1 h 30 min. Luego se procedió a teñir los geles de agarosa en una solución 1:10 de bromuro de etidio durante 20 minutos seguida de agua destilada durante 15 min para lavar excesos de bromuro de etidio. Luego se visualizaron las bandas de ADN obtenidas en un Trans-iluminador Benchetop UVP, y se procedió a fotografiar las geles teñidas y se registraron los resultados.

Análisis estadístico de los datos de RAPD. Las bandas polimórficas se contabilizaron como presencia (1) o ausencia (0), y los datos binarios se tabularon en una matriz indicando los polimorfismos encontrados con cada uno de los primers. Se utilizó el paquete estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2013) para realizar un análisis de correspondencia utilizando el coeficiente o índice de Dice (1945). Adicionalmente, se utilizaron los datos para elaborar un dendrograma, estableciendo así las agrupaciones a las que pertenecen las accesiones y, con esto, poder analizar su similitud y distancia genética.

Caracterización fenotípica

La siembra para la caracterización fenotípica en el campo se realizó en la época de invierno (1 de Junio de 2014), en el Lote 21 de la Zona II de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, 30 km al este de Tegucigalpa, Honduras ubicado a 800 m.s.n.m. con una temperatura y precipitación anual de 23°C y 1100 mm. Se utilizó una unidad experimental conformada por un surco de 3 m de largo por accesión. Se utilizaron distanciamientos de 0.7 m entre surcos y 0.1 m entre plantas. La fertilización fue de 95 kg/ha de 18-46-0 al momento de la siembra y a los 25 DDS se aplicó 45 kg/ha de urea al 46% y se realizó un aporque. La cosecha se realizó en diferentes fechas conforme las accesiones alcanzaban el estado de madurez fisiológica.

Diseño experimental. El diseño experimental usado para la siembra en el campo fue un diseño de bloques completos al azar (BCA) con 97 tratamientos y dos repeticiones.

Las características fenotípicas que se evaluaron en el estudio fueron las relacionadas a las etapas de desarrollo de la floración y la madurez fisiológica, hábito de crecimiento, color y rendimiento de grano. La caracterización de los recursos fitogenéticos es una herramienta útil para su conservación y aprovechamiento en el mejoramiento genético (Vargas Vásquez *et al.* 2008).

Días a floración. También llamado antesis, es el rango de tiempo comprendido desde el día de la siembra en suelo húmedo hasta la apertura del primer botón floral de la última planta de la población seleccionada para hacer la descripción varietal (Rosas *et al*. 2009).

Días a madurez fisiológica. Es el rango de tiempo transcurrido desde la siembra hasta observar un cambio de coloración de las vainas (pérdida de pigmentación verde) y desarrollo completo de las semillas (Rosas *et al*. 2009).

Hábito de crecimiento. Determinado por el genotipo e influenciado por factores ambientales, se refiere a la forma general de la planta. Se tomó en cuenta la escala de evaluación para describir el hábito de crecimiento del CIAT (1993) (
Anexo **6**).

Cuadro 4. Escala para evaluar los hábitos de crecimiento de las accesiones de frijol común de El Salvador y Honduras.

Tipo	Característica
1	Arbustivo determinado
2a	Arbustivo indeterminado con guía corta
2b	Arbustivo indeterminado con guía más o menos larga
3a	Postrado indeterminado con guía no trepadora
3b	Postrado indeterminado con guía trepadora
4a	Trepador indeterminado, con carga (vainas) a lo largo de la planta
4b	Trepador indeterminado, con carga (vainas) en los nudos superiores

Color de la flor. Rasgo definido por la corola (incluye las alas, el estandarte y la quilla) (Rosas *et al*. 2009).

Número de vainas. Característica cuantificada al momento de la cosecha. Para cada genotipo se contaron las vainas que tengan por lo menos una semilla viable en cada una de las 10 plantas muestreadas.

Número de semillas. Característica medida al momento de la cosecha. Se contaron las semillas en 10 vainas, una de cada una de las 10 plantas muestreadas.

Color del grano. Característica medida usando las semillas más cercanas al ápice de las vainas muestreadas (Rosas *et al*. 2009).

Peso seco en 100 semillas. Se cosecharon las semillas de las plantas seleccionadas para el conteo de número de vainas y se eligieron al azar 100 semillas las que se pesaron con una balanza digital.

Porcentaje (%) de humedad. Se midió la humedad de las semillas cosechadas en un medidor de humedad marca Burrows DMC500. Las semillas se secaron en un horno a 40°C hasta llegar aproximadamente al 14% de humedad.

Rendimiento. Fue determinado al final del ciclo del cultivo, utilizando la fórmula siguiente:

Rendimiento (g/planta)= [(PS/100) $_{x}$ NVP $_{x}$ NSV $_{x}$ NP/ha]/1000
En donde,
PS= Peso seco de 100 semillas (g)
NVP= Número de vainas por planta
NSV= Número de semilla por vaina
NP/ha= Número de plantas por hectárea

Análisis estadístico de los datos fenotípicos. Los datos de la caracterización fenotípica fueron analizados mediante análisis de varianza usando el software estadístico Statistix 8.1.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización genética usando marcadores RAPD

Los 22 primers utilizados en la caracterización molecular de las 97 accesiones de frijol común de El Salvador y Honduras mediante la técnica RAPD, generaron 225 bandas polimórficas de ADN que fueron identificadas por su presencia (1) o ausencia (0) en las accesiones. Los datos binarios registrados por presencia o ausencia fueron utilizados para el análisis de distanciamiento genético. Los primers usados presentaron diferentes cantidades de bandas polimórficas (Figura 1); siendo el OPC-11 el menor con tres bandas y el OPH-04 el mayor con 18 bandas.

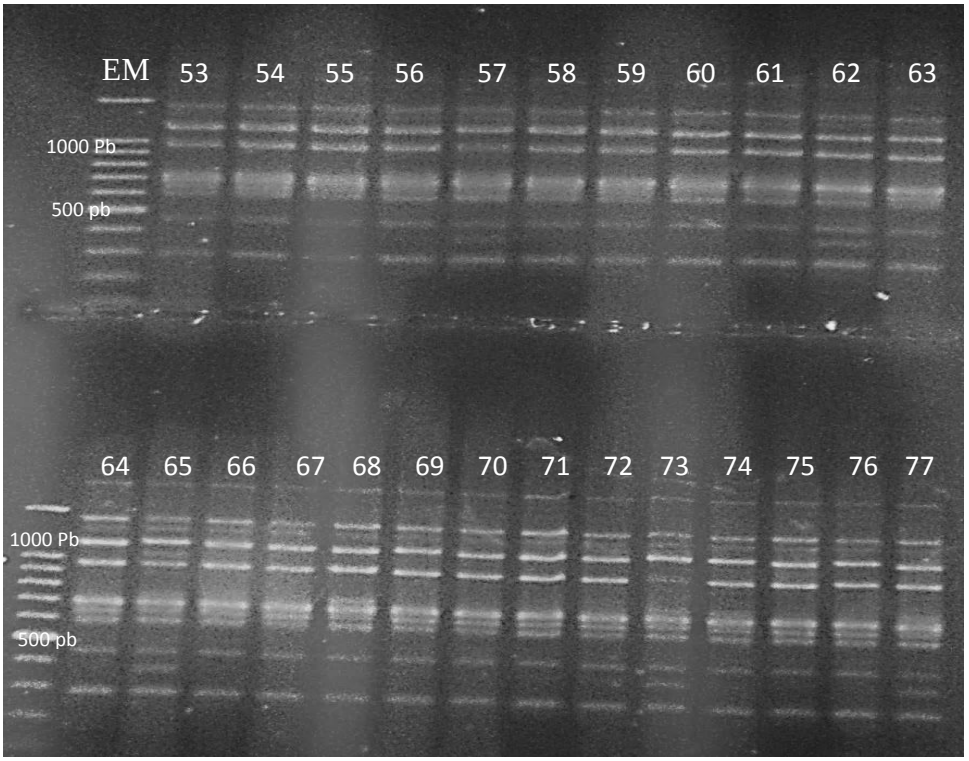

Figura 1. Gel de electroforesis del marcador RAPD OPC-04 mostrando la escalera molecular (EM) y las bandas o polimorfismos de ADN generados en 25 accesiones de frijol común de El Salvador. Zamorano, Honduras, 2014.

Con los datos de las bandas polimórficas observadas en las 97 accesiones de los dos países, se generó un dendrograma utilizando el Coeficiente de Dice (CD) o índice de similaridad con el software InfoStat (Figura 2). Se observa que las accesiones de El Salvador y las de Honduras conforman dos grupos o conglomerados principales separados uno del otro por sus diferencias genéticas (CD= 11.8) (Figura 3). El primer grupo (CD= 1.61) está compuesto por las 44 accesiones de Honduras. El segundo grupo (CD= 2.46) incluye las 50 accesiones de El Salvador y las tres variedades mejoradas.

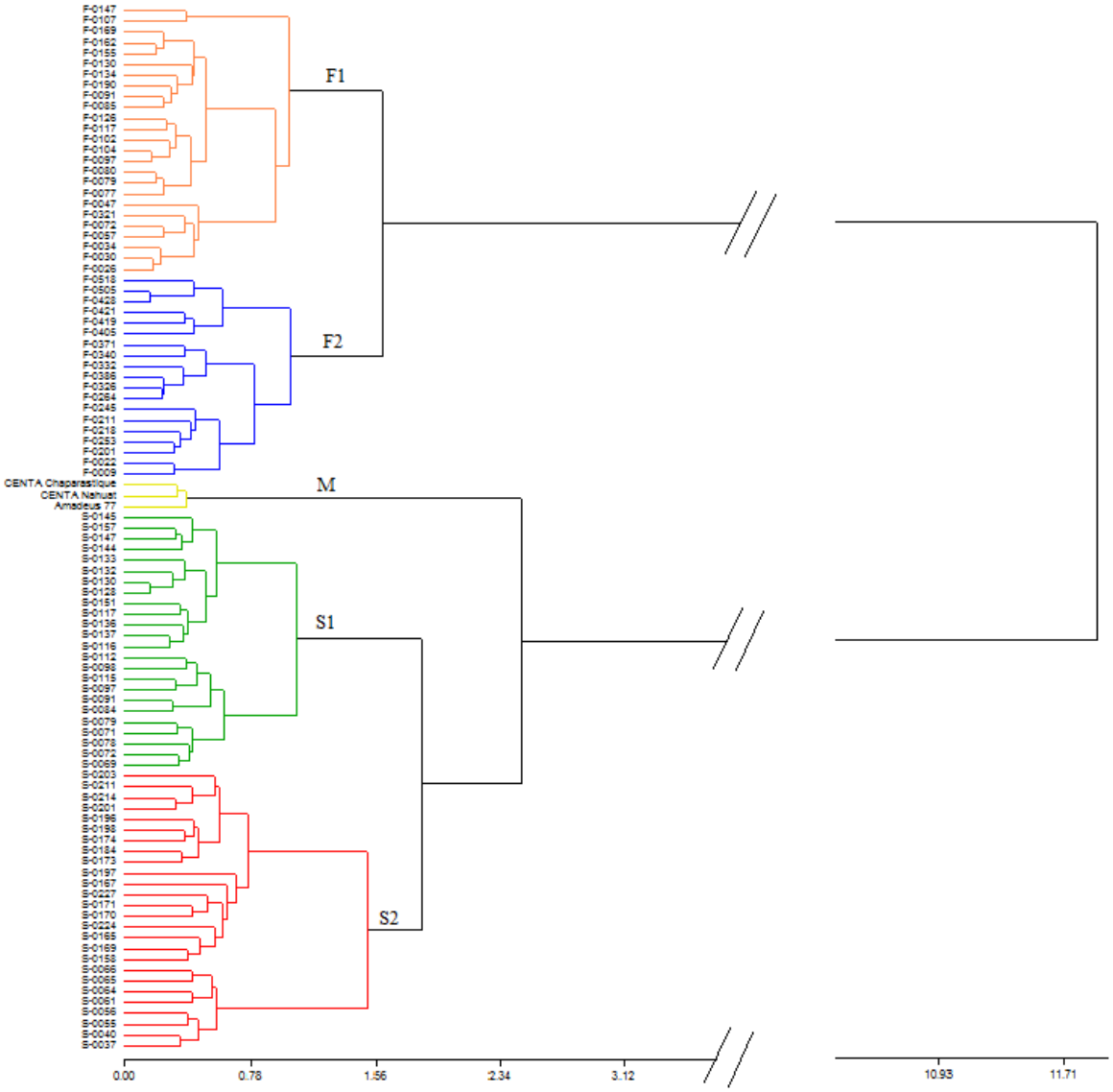

Figura 2. Dendrograma de las similitudes genéticas de 94 accesiones de los germoplasmas de frijol común de El Salvador (grupos S1 y S2) y Honduras (grupos F1 y F2) y variedades mejoradas (grupo M) según el Coeficiente de Dice.

El primer conglomerado incluye a las accesiones de frijol común de Honduras. Este conglomerado presenta dos sub-grupos F1 y F2 que difieren entre ellos en su composición genética (CD= 1.61) (Figura 3). El primer subgrupo (F1) incluye 25 accesiones de Honduras ordenadas en tres grupos menores con una composición genética más similar a los anteriores (CD= 1.04). Seguidamente cada uno de estos grupos menores se separan en varias grupos de accesiones más estrechamente similares entre ellos en sus composiciones genéticas (CD <0.52).genéticamente más similares entre sí. Por otro lado, dentro del

subgrupo F1 se encuentran accesiones de los departamentos de: Yoro, Olancho, Fco. Morazán y Sta. Bárbara con un (CD= 0.46) que los hace genéticamente más similares.

El segundo subgrupo (F2) del conglomerado que agrupa a las accesiones de Honduras contiene 19 accesiones criollas que se agrupan entre sí de acuerdo a su similitud genética (CD=1.00). Este subgrupo F2 presenta tres grupos menores que difieren en su composición genética (CD <0.75); dos de ellos presentan mayor similaridad genética entre sí. En este subgrupo F2 están incluidas accesiones de los departamentos de: El Paraíso, Choluteca, Ocotepeque con un (CD= 0.38) que los hace genéticamente más similares.

El segundo conglomerado incluye a las accesiones de frijol común de El Salvador y tres variedades mejoradas (CD= 2.4). Este conglomerado presenta tres subgrupos M, S1 y S2 que difieren entre ellos es su composición genética, 50 accesiones criollas de El Salvador (CD= 1.58) se divide en dos subgrupos. El subgrupo S1 incluye 24 accesiones (CD= 1.07), y en él están incluidas accesiones de los departamentos de Sonsonate, La Libertad y Santa Ana, genéticamente más similares entre sí (CD= 0.55). El subgrupo S2 incluye 26 accesiones de El Salvador (CD= 1.52). Seguidamente cada uno de estos subgrupos menores se separan en varios grupos de accesiones más estrechamente similares entre ellos en sus composiciones genéticas (CD <0.69). En este subgrupo S2 están incluidas accesiones de los departamentos de San Vicente genéticamente más similares entre sí (CD= 0.55).

Las variedades mejoradas Amadeus 77 (CENTA San Andrés), DEORHO (CENTA Nahuat) y Cardenal (CENTA Chaparrastique), las cuales son cultivadas en El Salvador y Honduras, se agrupan estrechamente entre sí (CD= 0.39) conformando el subgrupo M el cual se separan marcadamente de las accesiones criollas de El Salvador y el conglomerado de Honduras. La similaridad entre estas variedades mejoradas se debe a que comparten algunos progenitores entre sí. La variedad Amadeus 77 se deriva de la cruza Tío Canela 75/DICTA 105, DEORHO de la cruza Milenio/Tío Canela 75 y Cardenal de la cruza Milenio 47/Amadeus 77. Por otro lado, la explicación de que porque estas variedades son más afines genéticamente a las accesiones de El Salvador, se fundamenta en que en la genealogía de Tío Canela 75, varias generaciones atrás, se encuentra Porrillo Sintético, una variedad criolla de El Salvador utilizada por pequeños agricultores hace varias décadas.

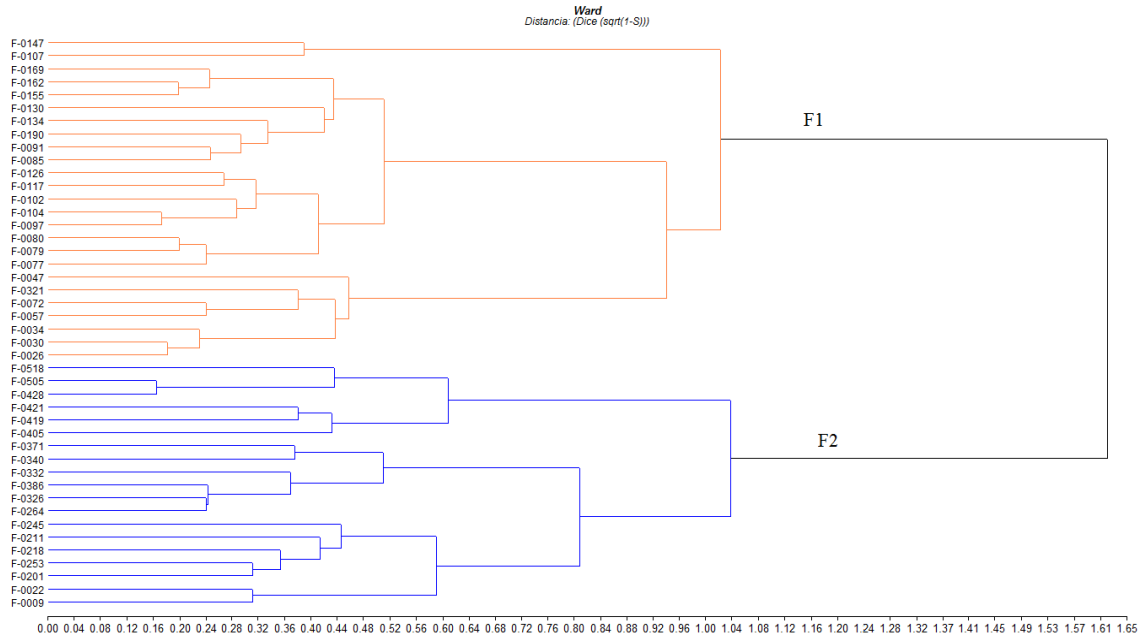

Figura 3. Dendrograma de las similitudes genéticas de 44 accesiones criollas de frijol común de Honduras según el Coeficiente de Dice.

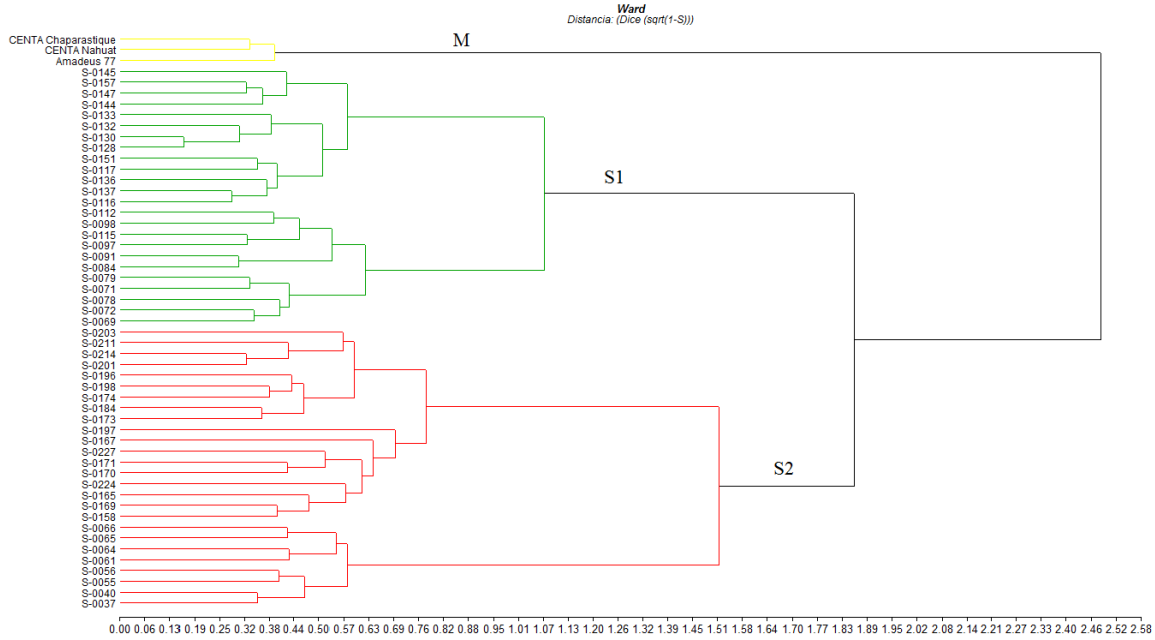

Figura 4. Dendrograma de las similitudes genéticas de 50 accesiones criollas de frijol común de El Salvador y tres variedades mejoradas según el Coeficiente de Dice.

El frijol ha sido cultivado desde tiempos ancestrales en la región de Centro América que forma parte del reservorio genético Mesoamericano que va desde el Sur de México hasta Costa Rica, por tal razón se podría pensar que en El Salvador y Honduras, al ser países pequeños y geográficamente cercanos, las accesiones de frijol son genéticamente similares. Lo anterior se podría argumentar por el intercambio de germoplasma entre pobladores de lo que en la actualidad constituye las regiones de los dos países, lo que explicaría encontrar accesiones genéticamente similares cultivadas en localidades geográficamente distantes.

Según los resultados de este estudio, aparentemente no han ocurrido intercambios significativos de germoplasma de frijol entre los pobladores de El Salvador y Honduras, lo que explicaría que la diversidad genética actual está representada por grupos genéticos diferentes. Lo anterior sugiere que los agricultores han conservado y utilizado eficientemente las variedades criollas desarrolladas en sus regiones y que ha habido un intercambio limitado entres estas países y regiones que han ocupado sus habitantes en la antigüedad.

Al observar en dendrograma generado en el estudio notamos que la diversidad genética de estos dos países de Centroamérica es muy amplia. Al igual que en el estudio realizado por Rubio Medina (2002) que encontró que existe una alta variabilidad genética en el germoplasma de frijol en Honduras. Herrera Dávila (2004) caracterizó molecularmente germoplasma cultivado y silvestre de frijol común de Honduras, e igualmente concluyo que existe una alta variabilidad genética en el germoplasma hondureño. Por otro lado, Hernández y Amaya (2013) en su estudio empleando marcadores RAPD determinaron que la colección núcleo de El Salvador también presenta una gran diversidad genética. El presente estudio pudo determinar que estas colecciones son genéticamente muy diversas entre y dentro de ellas.

Caracterización fenotípica en condiciones de campo.

Durante el ciclo del cultivo de las accesiones de frijol de El Salvador y Honduras, se presentaron condiciones limitadas de precipitación por lo que a los 12 DDS se aplicó un riego por aspersión de una lámina de agua de 25 mm. Aunque estas condiciones no limitaron la toma de datos de las variables morfológicas y agronómicas, si afectó el rendimiento y sus componentes. Entre las 94 accesiones criollas analizadas se encontró nombres varietales repetidos; sin embargo, estas accesiones son provenientes de distintas zonas de El Salvador y Honduras, por lo que se decidió trabajar con los códigos que se les asigna a las accesiones en los bancos de germoplasma en vez de sus nombres comunes.

En la caracterización fenotípica de las accesiones de frijol común se observaron diferencias en la mayoría de las variables estudiadas. Las variables estudiadas fueron días a floración, días a madurez fisiológica, hábito de crecimiento, color de la flor, número de vainas por planta, número de semillas por vaina, peso seco en 100 semillas (al 14% de humedad), porcentaje (%) de humedad, color del grano y rendimiento (g/p). En el Cuadro 5 se presenta el resumen de los datos de las variables cuantitativas evaluadas en las accesiones de frijol común en el campo.

Cuadro 5. Resumen estadístico de las características fenotípicas cuantitativas evaluadas en 97 accesiones de frijol común de El Salvador y Honduras.

Variable	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Días a floración	34.1	2.52	29	42
Días a madurez fisiológica	57.9	5.74	45	69
No. de vainas por planta	19.5	6.44	7	51
No. de semilla por vaina	6.2	0.71	4	8
Rendimiento (g/planta)	22.04	9.04	8	58

Los primeros datos de caracterización fenotípica se tomaron en la etapa de floración; se registraron los días a floración, el color de flor y el hábito de crecimiento. Para la accesión S-0224 solo se registró el hábito de crecimiento debido a que por su falta de adaptación a condiciones de Zamorano no llegó a producir flores durante la duración del ensayo.

Los colores de la flor observados fueron los más comunes para esta especie, presentándose flores blancas (61%), moradas (17%) y lilas (22%) en las accesiones de El Salvador y Honduras (Figura 5).

Figura 5. Color de la flor de las accesiones criollas de El Salvador. Foto proporcionadas por el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova" (CENTA), El Salvador.

Se encontró que las accesiones de frijol común evaluadas florecen entre 29-42 DDS (Cuadro 5, Figura 6). En promedio, los días a floración de las accesiones ocurrió a los en 34 DDS; y el 48% de las accesiones florecieron antes del día 33. La floración temprana es una característica de la mayoría de las variedades criollas de Centro América.

El hábito de crecimiento se identificó usando los hábitos de crecimiento propuestos por CIAT 1993 (Cuadro 4). Se determinó que el hábito de crecimiento predominante fue el tipo 3a- Postrado indeterminado con guía no trepadora-, presente en un 82.5% de las accesiones evaluadas. En menores porcentajes se encontraron accesiones tipo 3b- Postrado indeterminado con guía trepadora (9.3%), y el tipo 2- Arbustivo indeterminado (8.2%) (Anexo 4).

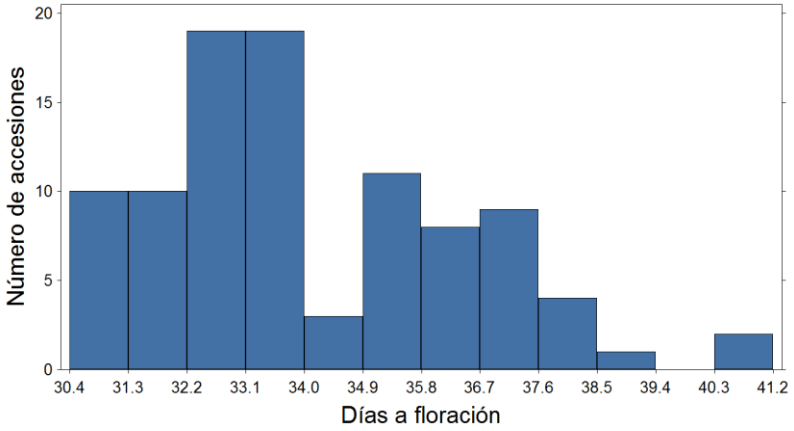

Figura 6. Distribución de la frecuencia de días a floración de las 97 accesiones de frijol común de El Salvador y Honduras.

Respecto al tiempo transcurrido para llegar a madurez fisiológica, se encontró que en promedio fue a los 58 DDS. La accesión más precoz alcanzó esta etapa a los 45 DDS y las más tardías a los 69 DDS (Cuadro 5, Figura 7). Como en el caso de la floración, la mayoría de accesiones criollas de Centro América alcanza la madurez fisiológica más temprano que las variedades mejoradas. Aunque pudiera considerarse que la precocidad es una ventaja en sistemas donde el cultivo de frijol está sujeto a sequía terminal ocasionado por la reducción en las lluvias, sobretodo en la siembras de postrera, por otro lado, esta precocidad limita el desarrollo vegetativo y el potencial de rendimiento.

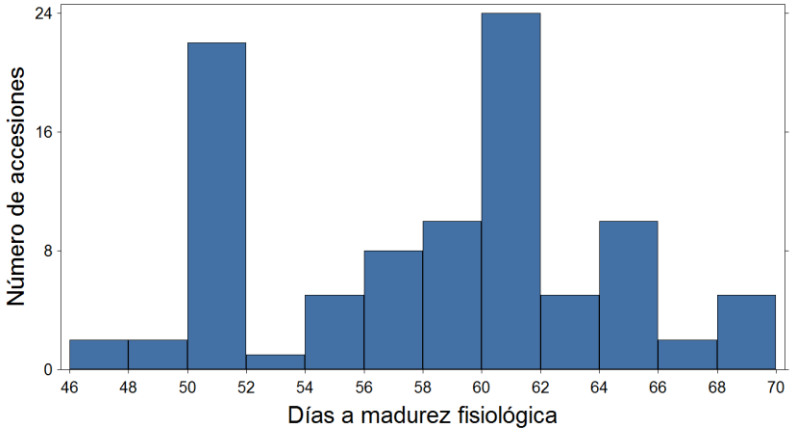

Figura 7. Distribución de la frecuencia de días a madurez fisiológica de las 97 accesiones de frijol común de El Salvador y Honduras.

Cuando las plantas llegaron a madurez de cosecha fueron cosechadas para determinar la variable del número de vainas por planta. El genotipo de menor número de vainas tuvo

una producción de 10 vainas en promedio y el que más vainas produjo tuvo 50; y las accesiones produjeron en promedio 20 vainas por planta (Cuadro 5, Figura 8).

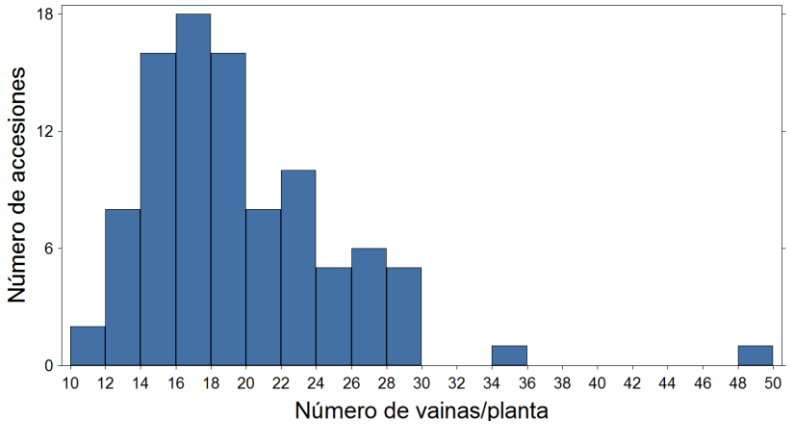

Figura 8. Distribución de la frecuencia del número de vainas por planta de las 96 accesiones de frijol común de El Salvador y Honduras.

De las plantas cosechadas para registrar el número de vainas se seleccionaron vainas para conocer las variaciones en el número de semillas de las accesiones (Figura 10). El genotipo con menor número de semillas por vaina tuvo 5 semillas; tres genotipos produjeron 8 semillas por vaina, siendo este el valor más alto. El promedio de semillas por vaina fue 6.

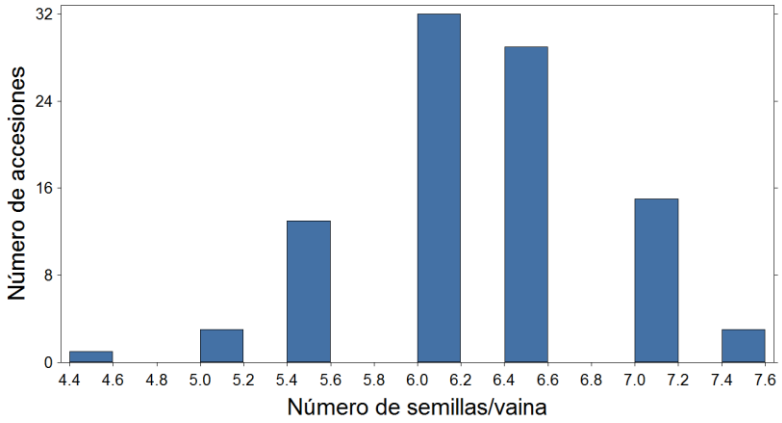

Figura 9. Distribución de la frecuencia de número de semillas por vaina de las 96 accesiones de frijol común de El Salvador y Honduras.

Después de la cosecha y una vez determinados los datos de peso seco de 100 semillas y el porcentaje de humedad se calculó el rendimiento de cada accesión en gramos por planta (g/p). El rendimiento promedio de todas las accesiones fue 58 g/p. El rendimiento más bajo fue de 8 y el más alto llegó hasta 22.04 g/p (Figura 10). Esta variación en el

rendimiento permite considerar la posibilidad de utilizar las accesiones de mayor rendimiento en programas de mejoramiento, teniendo en cuenta su adaptación a nichos ecológicos específicos y otras características fenotípicas importantes.

Teniendo en cuenta que los principales componentes de rendimiento son el número de vainas por planta, el número de semilla por vaina y el peso seco de 100 semillas, se debe considerar cuales accesiones pudieran aportar combinaciones genéticas que a través del mejoramiento genético pudiera potencial el valor de los germoplasmas evaluados.

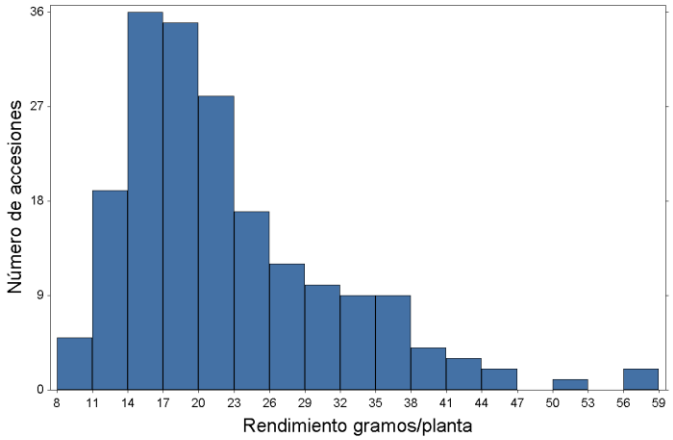

Figura 10. Distribución de la frecuencia de rendimiento (g/p) de 96 accesiones de frijol común de El Salvador y Honduras.

Se encontraron 10 colores de grano diferentes en las accesiones evaluadas (Figura 11). Se encontraron accesiones con granos de colores blanco limpio, café, rosado, rojo claro, rojo claro moteado, rojo intermedio, rojo oscuro, morado, morado moteado y negro. El color predominante de semilla de las 97 accesiones fue el rojo claro (33 %), seguido de rosado (26%), negro (12.4%), rojo intermedio (10.4%), rojo oscuro (6.2%). El resto de las accesiones presentaron granos con colores café, morado y morado moteado (9%) y el color de grano blanco limpio (2%).

Figura 11. Variaciones en el color de grano de las 97 accesiones de El Salvador y Honduras.

4. CONCLUSIONES

- El uso de la técnica con marcadores moleculares RAPD permitió determinar que las colecciones de El Salvador y Honduras representan dos reservorios genéticos diferentes en los que existe a su vez una gran diversidad genética. Las variedades mejoradas son más cercanas al germoplasma de El Salvador por tener en sus genealogías ancestros procedentes de este país.

- Las colecciones de frijol común de El Salvador y Honduras presentaron variaciones significativas en las características fenotípicas de color de la flor, días a floración y madurez fisiológica, hábito de crecimiento, color del grano; así como en el rendimiento y sus componentes: número de vainas por planta, número de semillas por vaina y peso seco de 100 semillas, sugiriendo un valor potencial importante de estos germoplasmas de frijol para su uso en mejoramiento genético.

5. RECOMENDACIONES

- Continuar con la caracterización molecular de las accesiones de frijol común con un número superior de RAPD para incrementar los datos de los polimorfismos, mejorar el análisis y tener una agrupación de las accesiones más precisa de acuerdo a la similaridad genética.

- Ampliar la caracterización fenotípica de las accesiones de frijol común en diferentes zonas y épocas de siembra del cultivo en Honduras y El Salvador, para determinar el valor potencial de accesiones sobresalientes para fines de mejoramiento, incluyendo la adaptación al cambio climático.

6. LITERATURA CITADA

- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal). 2012. Catálogo geográfico de las accesiones de germoplasma de frijol común de El Salvador. Manuscrito. El Salvador.

- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal). 2011. Guía Técnica para el Manejo de las Variedades de Frijol. Manuscrito. El Salvador.

- Dice LR. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology 26: 297-302.

- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2010. Los recursos zoo-genéticos mundiales para la alimentación y la agricultura. Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética. (en línea) Disponible en http://www.fao.org/docrep/012/a1250s/a1250s.pdf

- Guachambala, M.S., Rosas, J.C. 2010. Caracterización Molecular de Accesiones Cultivadas y Silvestres de Frijol Común de Honduras. Agronomía Mesoamericana 21(1):51-61.

- IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura)-Proyecto Red SICTA (Sistema de Integración Centroamericano de Tecnología Agrícola). 2007. Mapeo de las cadenas agroalimentarias de maíz blanco y frijol en Centroamérica. Proyecto Red SICTA; IICA/COSUDE. INPASA. Managua. 132 p.

- Kumar, P., Gupta V.K., Misra A.K., Modi D.R., Pandey B.K. 2009. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. Plant Omics Journal 2(4): 141-162.

- Sorrells, M.E. 2007. Application of new knowledge, technologies, and strategies to wheat improvement. Euphytica 157:299-306.

- Rosas, J.C. 2004. Recursos genéticos del género Phaseolus en Honduras. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Litocom Press, Tegucigalpa, Honduras, 40 p.

- Rosas, J.C. 2011. Contribuciones del Programa de Investigaciones en Frijol en Centro América y El Caribe. Ceiba (52(1): 65-73.

- Rosas, J.C., Guachambala, M.S., Ramos, R.A. 2009. Guía Ilustrada para la descripción de las características de variedades de frijol común. Programa de Investigación de Frijol (PIF). Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. 22 p.

- Rubio Medina, R.D. 2002. Caracterización de la diversidad genética del germoplasma hondureño de frijol común. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 72 p.

- Vargas Vásquez, M., Muruaga Martínez, J., Perez Herrera, P., Gill Langarica, H., Esquivel Esquivel, G., Martínez Damian, M., Rosales Serna, R. y Mayek Perez, N. 2008. Caracterización morfoagronómica de la colección núcleo de la forma cultivada de frijol común del INIFAP. del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, México. 10 p.

7. ANEXOS

Anexo 1. Accesiones de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.*)* del Banco de Germoplasma "Enrique Álvarez Córdova" del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) de El Salvador y del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF), Zamorano, Honduras.

No. Accesión	Código BGC	Nombre Local	Departamento	Latitud	Longitud
		Accesiones criollas de frijol Honduras			
1	F-0009	Concha Blanca	Yoro	15°04'40"	87°22'15"
2	F-0022	Cuarenteño	Olancho	15º 04' 40"	87º 22' 15"
3	F-0026	Marcialeño	Olancho	14º 33' 15"	86º 17' 20"
4	F-0030	Chilito	Olancho	14º 44' 35"	86º 05' 30"
5	F-0034	Gualiqueme	Yoro	14º 55' 20"	86º 21' 30"
6	F-0047	Frijol de Montaña	Yoro	15º 06' 15"	87º 10' 30"
7	F-0057	Vaina Rosada	Yoro	15º 01' 55"	87º 16' 45"
8	F-0072	Desarrural	Fco. Morazán	15º 12' 20"	87º 22' 00"
9	F-0077	Frijol Arbolito	Fco. Morazán	13º 41' 50"	87º 08' 40"
10	F-0079	Frijol Rojo	Valle	13º 47' 35"	87º 28' 10"
11	F-0080	Retinto Rojo	Valle	13º 39' 40"	87º 32' 00"
12	F-0085	Chelito	Valle	13º 39' 40"	87º 32' 00"
13	F-0091	Cuarenteño	Choluteca	13º42' 35"	87º 33' 20"
14	F-0097	Arbolito	Choluteca	13º 18' 05"	86º 59' 20"
15	F-0102	Sangre de Toro	Sta. Bárbara	13º 15' 40"	86º 59' 20"

16	F-0104	Retinto Vaina Blanca	Sta. Bárbara	15°03' 30"	88º 25' 00"
17	F-0107	Frijol Ñato	Comayagua	14°42' 35"	88º 05' 20"
18	F-0117	Danlí	Comayagua	14°54' 30"	87º 19' 30"
19	F-0126	Negro Ligero	Intibucá	14°54' 45"	87º 22' 40"
20	F-0130	Talete	Intibucá	14°18' 15"	88º 23' 10"
21	F-0147	Chile	Copan	14°00' 00"	88º 22' 40"
22	F-0134	Milpero	Intibucá	15°02' 10"	88º 45' 55"
23	F-0155	Arbolito Rojo, Vaina	Copan	14°16' 55"	88º 14' 35"
24	F-0162	Liberalito	Sta. Bárbara	15°08' 40"	88º 40' 30"
25	F-0169	Cincuenteño	Copan	15°01' 35"	88º 38' 40"
26	F-0190	Talete de Guía	Lempira	14°01' 00"	88º 52' 00"
27	F-0201	Talete	Lempira	14°49' 50"	88º 36' 30"
28	F-0211	Alilí	Lempira	14°26' 50"	88º 39' 25"
29	F-0218	Arbolito Rojo	Lempira	14°06' 00"	88º 34' 05"
30	F-0245	Gringo	Ocotepeque	14°02' 00"	88º 37' 00"
31	F-0253	Negro	Ocotepeque	14°30' 15"	88º 48' 55"
32	F-0264	Arbolito	Ocotepeque	14°28' 45"	89º 12' 35"
33	F-0321	Vaina Blanca	Sta. Bárbara	14°18' 20"	89º 01' 10"
34	F-0326	Pronto a la Olla	El Paraíso	15°28' 00"	88º 31' 00"
35	F-0332	Seda	El Paraíso	14°06' 01"	86º 05' 36"
36	F-0340	Chile	El Paraíso	13°53' 50"	85º 53' 50"
37	F-0386	Vaina Blanca	Choluteca	13°49' 02"	86º 24' 14"
38	F-0371	Moro	Choluteca	15°15' 40"	86º 56' 54"
39	F-0405	Arbolito Vaina Blanca	Atlántida	13°30' 00"	87º 11' 30"

40	F-0419	Chile	Atlántida	15º39'43"	86º 40' 25"
41	F-0421	Vaina Roja Arbolito	Atlántida	15º39'35"	87º 25' 50"
42	F-0428	Rojo	Olancho	15º38'39"	87º 21' 47"
43	F-0505	Liberal	Fco. Morazán	15º19'00"	86º 33' 55"
44	F-0518	Frijol Mantequilla	Fco. Morazán	14º48' 40"	86º56' 00"

Accesiones criollas de frijol de El Salvador

45	S-0037	Negro Tineco	Sonsonate	13° 44´09.8'	89°49'26.2'
46	S-0040	Vaina de Pito	Sonsonate	13°45'49.6'	89°56'02.1'
47	S-0055	Pando	La Paz	13°30.538'	88°50.879'
48	S-0056	Vicentino	La Paz	13°30.740'	88°50.847'
49	S-0061	Pando	San Vicente	13°39.706'	88°52.450
50	S-0064	Tongoloy	San Vicente	13°39.959'	88°52.187'
51	S-0065	Cuarenteño Negro	San Vicente	13°39.764'	88°52.942'
52	S-0066	Sedón	San Vicente	13°38.157'	88°46.651'
53	S-0069	Vaina blanca	San Vicente	13°40.092'	88°50.847'
54	S-0071	San Juan	Cabañas	13°47.892'	88°53.586'
55	S-0072	Seda Cuarenteño rojo	Santa Ana	14°03'26.9'	89°40'27.4'
56	S-0078	Chema	La Unión	13°17.499	87°52.300
57	S-0079	Colocho o Cuarentano	La Unión	13°15.476'	87°55.053
58	S-0084	Sangre de Toro	La Unión	13°15.390'	87°55.117´
59	S-0091	Seda Rosa Grueso y San Francisco	San Miguel	13°26.969	88°13.391
60	S-0097	Pinto o Quilite	Usulután	13°25.208'	88°32.713'
61	S-0098	Rojo de Seda	La Libertad	13°47´52.9´	89°06´34.2

62	S-0112	Seda de Gajo	Cabañas	13°52.459'	88°39.615
63	S-0115	Panza de Rana	Ahuachapán	14°01.540'	89°47.028'
64	S-0116	Seda Catracho Rojo	Ahuachapán	14°01.540'	89°47.028'
65	S-0117	Naranjo	Ahuachapán	14°01.540'	89°47.028'
66	S-0128	Lilon Seda	Santa Ana	13°49.304'	89°30.425'
67	S-0130	Sedón (vaina morada)	Sonsonate	13°44.462'	89°27.539'
68	S-0132	Rojo Pantaleón	La Libertad	13°47´44.4´	89°27´27.3
69	S-0133	Cuarenteño Rojo Saradito	Sonsonate	13°42.285'	89°39.406´
70	S-0136	Tineco Negro (vaina morada)	Sonsonate	13°42.285'	89°39.406'
71	S-0137	Juan Diaz	Sonsonate	13°42.125'	89°39.432'
72	S-0144	Sedón	Ahuachapán	13°58'36.9'	89°43'38.3'
73	S-0145	Sedita	Sonsonate	13°45'04.1'	89°56'05.1'
74	S-0147	Seda Pálido	Sonsonate	13°52'11"	90°01'44"
75	S-0151	Tineco Vaina Morada	Sonsonate	13°45'59.8"	89°46'42.3'
76	S-0157	Sedita	Santa Ana	14°08'29.0"	89°32'02.84
77	S-0158	Frijol Seda Chapín	Santa Ana	14°14'27.53'	89°28'21.60'
78	S-0165	Rojito	Chalatenango	14°07´10.94´	89°21'27.35"
79	S-0167	Frijol Quiliete Rojo	Ahuachapán	13°45'06.75'	89°56'04.38"
80	S-0169	Sedita	Ahuachapán		
81	S-0170	Huizucar	Ahuachapán		
82	S-0171	Quiliete Negro	Ahuachapán	13°45´52.80´	89°56'02.17'
83	S-0173	Frijol Lila	Ahuachapán	13°46'30.03'	089°55'02.93'
84	S-0174	Catrachito	Santa Ana	14°02'32.28'	089°36'56.89'

85	S-0184	Sangre de Toro	Santa Ana	14°07'14.22'	089°39'24.75'
86	S-0196	Negro Cuarenteño	Ahuachapán	13°58'33.36'	089°46'32.33'
87	S-0197	Seda Beliceño	Ahuachapán	14°01.540'	89°47.028'
88	S-0198	Seda Costarricense	Ahuachapán	14°01.540'	89°47.028'
89	S-0201	Blanco de Matocho	Ahuachapán	13°62'50.34'	89°55'54.44"
90	S-0203	Negro Porrillo	Ahuachapán	13°62'50.34'	89°55'54.44"
91	S-0211	Chacalín	Ahuachapán	13°51'33.84'	90°00'49.93"
92	S-0214	Lila Vaina Morada	La Libertad	13°44'03.12"	89°27´57.40”
93	S-0224	Frijolón	Cuscatlán	13°41'36.02"	88°57´01.57´
94	S-0227	Vaina Blanca	Cuscatlán	13°41'36.02"	88°37´01.57”
	Variedades Mejoradas de frijol				
95		CENTA San Andrés	Amadeus 77		
96		CENTA Nahuat	DEOHRO		
97		CENTA Chaparrastique	Cardenal		

Anexo 2. Extracción de ADN para el análisis RAPD por el método de la Universidad de Wisconsin (UW)-Madison, adaptado por Laboratorio de Biotecnología Aplicada de Zamorano.

1. Cosechar tejido fresco de plantas (6-8 mitades de hojas jóvenes)
2. Agregar 50 µl de buffer de extracción (PEX) en un tubo para microcentrífuga eppendorf de 1.5 ml. Macerar el tejido en el tubo usando una barra (pestle) de plexiglás de laboratorio. Agregar 450 µl adicionales de buffer PEX y agitar el tubo en el vortex.
3. Lo más pronto posible (antes de 1 hora), colocar los tubos con las muestras de tejido en baño maría a 65 °C durante 30-60 minutos.
4. Centrifugar la muestra durante 10 minutos a >14,000 RPM (alta velocidad) usando microcentrífuga, para concentrar los residuos de tejidos de tejido (pellet).
5. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml limpio. Precipitar los ácidos nucleótidos llenando los tubos con una mezcla de 6:1 de etanol: acetato de amonio 7.5 M. mezclar invirtiendo los tubos y dejar precipitar por 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Agitar los tubos manualmente para romper el precipitado. Paletear los ácidos nucleótidos precipitados centrifugando las muestras a 3,000 RPM (baja velocidad) durante 10 minutos en una microcentrífuga.
7. Eliminar el sobrenadante. Agregar a los tubos con pellets 300 µl de RNAasa A (concentración de 100 µg/ml) + buffer TE¥ 0.1 X (juntas). Agitar los tubos manualmente y colocarlos a incubar en baño maría a 37 °C por una hora.
8. Centrifugar las muestras a >14,000 RPM por un minutos (tres minutos si se desean muestras más limpias), para peletizar los residuos de tejidos remanentes.
9. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 ml.
10. Precipitar el ADN llenando los tubos con una mezcla 10:1 de etanol: acetato de sodio 3 M. Mezclar invirtiendo los tubos y permitir que se precipiten a temperatura ambiente por un tiempo no mayor a 30 minutos.
11. Agitar bien los tubos manualmente para romper el precipitado, antes de proceder a peletizarlo. Centrifugar las muestras por 5 minutos a 3,000 RPM para peletizar el ADN.
12. Vaciar el etanol/acetato de sodio y lavar los pellets llenando los tubos con 70% etanol, agitar manualmente.
13. Colectar los pellets centrifugados por 15 segundos a 14,000 RPM.
14. Vaciar el etanol y secar los pellets invirtiendo los tubos sobre papel toalla (2-3 horas o de un día para el otro).
15. Rehidratar los pellets agregando 100-200 µl de buffer TE 0.1X (dependiendo de su tamaño). Ayudar a disolverlos colocando los tubos a baño maría a 65 °C durante 15 minutos.

16. Almacenar las muestras de ADN en un congelador a -20 °C. A partir de este paso es necesario para efectuar las reacciones para su amplificación.

¥Buffer TE (TRIS HCl 1 M, pH= 7.5; EDTA 0.5 M, pH= 8)

Anexo 3. Cuantificación de ADN para el análisis RAPD usando Quantus™ Fluorometer, adaptado por el Laboratorio de Biotecnología Aplicada de Zamorano.

1. Calibrar el cuantificador usando las muestras estándar y testigo recomendado por Quantilfluor®.
2. Seleccione el protocolo y el volumen de la muestra deseada. Para conocer la concentración de ADN en cada muestra se le agrega 1µl de ADN más 99µl de buffer TE al 1X y 100µl de solución de trabajo QuantiFluor® Dye (volumen de ensayo final de 200µl); entonces el volumen que se debe introducir en la pantalla debe ser 1µl.
1. Coloque las muestras dentro del soporte para tubos y cierre la tapa. El aparato medirá automáticamente la fluorescencia cuando la tapa esté cerrada y la concentración calculada de ácidos nucleicos será mostrada en la pantalla.

Anexo 4. Características morfológicas de las accesiones de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.*)* del Banco de Germoplasma "Enrique Álvarez Córdova" del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) de El Salvador y del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF), Zamorano, Honduras

Código	Días a floración		Días a madurez fisiológica		Color de flor[α]	Hábito de crecimiento[β]	N° vainas por planta	
F-0009	37	CDEFG *	68	AB	1	3b	15	NOPQRSTU
F-0022	33	JKLMNO	56	P	1	3a	19	GHIJKLMNOPQRST
F-0026	31	NO	50	RST	1	3a	20	FGHIJKLMNOPQRS
F-0030	32	LMNO	57	NOP	1	3a	13	QRSTU
F-0034	35	FGHIJK	65	DEFG	1	3a	16	MNOPQRSTU
F-0047	39	ABC	66	BCD	1	3a	22	CDEFGHIJKLMNOP
F-0057	35	FGHIJK	65	DEFG	1	3a	20	FGHIJKLMNOPQRS
F-0072	32	LMNO	51	QRS	1	3a	19	GHIJKLMNOPQRST
F-0077	33	JKLMNO	61	IJK	2	3a	19	HIJKLMNOPQRST
F-0079	34	HIJKLM	64	EFG	1	3a	20	FGHIJKLMNOPQRS
F-0080	36	DEFGHI	63	FGH	1	3a	19	GHIJKLMNOPQRST
F-0085	32	LMNO	59	JKLM	1	3a	24	CDEFGHIJKLM
F-0091	36	DEFGHI	58	LMNO	1	3a	18	JKLMNOPQRSTU
F-0097	32	LMNO	56	OP	2	3a	18	IJKLMNOPQRSTU
F-0102	31	NO	56	OP	2	3a	12	STU
F-0104	34	IJKLMN	63	GHI	1	3a	17	KLMNOPQRSTU
F-0107	34	IJKLMN	66	CDE	1	3a	21	DEFGHIJKLMNOPQ
F-0117	37	CDEFG	65	CDEF	1	3a	30	BC
F-0126	31	O	51	QRS	3	3a	29	BCD
F-0130	37	CDEFGH	60	JKL	1	3a	27	CDEFGH
F-0147	33	JKLMNO	60	JKL	1	3a	23	CDEFGHIJKLMNOP
F-0134	34	HIJKLM	61	IJK	1	3a	22	CDEFGHIJKLMNO
F-0155	41	AB	64	DEFG	1	3b	25	CDEFGHIJK
F-0162	37	CDEFG	58	LMNO	1	3b	23	CDEFGHIJKLMNO
F-0169	31	NO	50	RST	3	3b	29	BCD
F-0190	37	CDEFGH	61	HIJ	1	3a	21	DEFGHIJKLMNOPQ
F-0201	41	A	63	FGH	1	3a	20	FGHIJKLMNOPQRST
F-0211	38	BCDE	61	IJK	1	3a	28	BCDEF
F-0218	33	KLMNO	51	QRS	1	3a	19	GHIJKLMNOPQRST
F-0245	38	CDEF	69	A	1	2a	16	MNOPQRSTU
F-0253	32	MNO	48	U	3	3a	10	U
F-0264	35	FGHIJK	61	IJK	3	3a	17	KLMNOPQRSTU
F-0321	34	HIJKLM	58	LMNO	1	3a	19	GHIJKLMNOPQRST
F-0326	31	O	47	U	2	3a	21	EFGHIJKLMNOPQR
F-0332	34	IJKLMN	51	QRS	1	3a	23	CDEFGHIJKLMNO
F-0340	35	GHIJKL	61	IJK	1	3b	19	HIJKLMNOPQRST
F-0386	35	FGHIJK	69	A	1	2a	27	CDEFGHI

F-0371	38	CDEF	59	JKLM	3	3a	26	CDEFG
F-0405	38	BCDE	61	IJK	2	3a	27	CDEFG
F-0419	34	HIJKLM	61	IJK	1	3a	26	CDEFGHI
F-0421	35	FGHIJK	60	JKL	2	3a	25	CDEFGHIJKL
F-0428	36	DEFGHI	60	JKL	2	3a	25	CDEFGHIJKL
F-0505	38	BCDE	59	KLMN	2	3a	16	MNOPQRSTU
F-0518	37	CDEFG	67	ABC	1	3a	29	BCDE
S-0037	33	KLMNO	61	OP	3	3a	12	STU
S-0040	31	O	50	IJK	2	3a	18	JKLMNOPQRSTU
S-0055	35	FGHIJK	61	DEFG	1	3a	15	OPQRSTU
S-0056	35	GHIJKL	56	IJK	1	2a	14	QRSTU
S-0061	34	HIJKLM	56	RST	1	3a	13	RSTU
S-0064	32	MNO	51	IJK	1	3a	14	QRSTU
S-0065	34	IJKLMN	50	OP	3	3b	17	LMNOPQRSTU
S-0066	35	FGHIJK	56	P	1	3a	14	PQRSTU
S-0069	32	LMNO	60	QRS	1	2a	16	MNOPQRSTU
S-0071	38	CDEF	65	RST	1	3a	25	CDEFGHIJK
S-0072	32	MNO	58	P	1	3a	15	NOPQRSTU
S-0078	31	O	49	JKLM	2	3a	19	GHIJKLMNOPQRST
S-0079	31	NO	52	DEFG	3	3a	15	OPQRSTU
S-0084	32	MNO	52	LMNO	2	3a	18	IJKLMNOPQRSTU
S-0091	34	HIJKLM	61	STU	1	3a	22	CDEFGHIJKLMNOP
S-0097	33	KLMNO	53	QR	3	3a	12	TU
S-0098	33	JKLMNO	51	QR	2	3a	17	LMNOPQRSTU
S-0112	39	ABCD	64	IJK	1	3a	36	B
S-0115	33	KLMNO	52	Q	1	3a	17	LMNOPQRSTU
S-0116	34	IJKLMN	61	QRS	1	3a	15	NOPQRSTU
S-0117	37	CDEFGH	64	EFG	1	3a	21	DEFGHIJKLMNOPQ
S-0128	35	GHIJKL	56	QR	1	3a	17	KLMNOPQRSTU
S-0130	36	DEFGHI	57	IJK	1	3a	20	FGHIJKLMNOPQRST
S-0132	33	KLMNO	51	DEFG	2	3a	15	OPQRSTU
S-0133	33	KLMNO	61	P	1	3a	23	CDEFGHIJKLMN
S-0136	33	KLMNO	51	NOP	3	3b	24	CDEFGHIJKLM
S-0137	33	JKLMNO	51	QRS	1	3a	15	NOPQRSTU
S-0144	33	JKLMNO	61	IJK	1	3a	17	KLMNOPQRSTU
S-0145	31	NO	51	QRS	3	3a	16	MNOPQRSTU
S-0147	36	EFGHIJ	60	QRS	1	3a	29	BCDE
S-0151	34	IJKLMN	52	HIJ	3	3a	18	JKLMNOPQRSTU
S-0157	34	IJKLMN	69	QRS	1	3a	50	A
S-0158	33	KLMNO	52	JKL	1	3a	26	CDEFGHIJ
S-0165	32	LMNO	50	QR	2	3b	14	QRSTU
S-0167	33	KLMNO	50	A	2	3a	18	JKLMNOPQRSTU
S-0169	35	FGHIJK	56	QR	2	3a	16	MNOPQRSTU
S-0170	33	JKLMNO	61	RST	3	2a	17	LMNOPQRSTU

S-0171	33	JKLMNO	61	RST	3	3a	17	KLMNOPQRSTU
S-0173	35	FGHIJK	61	P	2	3b	15	NOPQRSTU
S-0174	34	HIJKLM	58	IJK	2	2a	18	IJKLMNOPQRSTU
S-0184	33	KLMNO	60	IJK	1	3a	21	DEFGHIJKLMNOPQ
S-0196	31	NO	48	IJK	3	3a	16	MNOPQRSTU
S-0197	35	FGHIJK	58	LMNO	3	2a	12	STU
S-0198	38	CDEF	61	JKLM	1	3a	15	NOPQRSTU
S-0201	33	KLMNO	56	TU	1	3a	16	MNOPQRSTU
S-0203	38	CDEF	69	MNOP	3	3a	22	CDEFGHIJKLMNOP
S-0211	34	IJKLMN	52	IJK	1	3a	20	FGHIJKLMNOPQRST
S-0214	37	CDEFGH	64	OP	1	3a	20	FGHIJKLMNOPQRST
S-0224[v]	-		-		-	3a	-	
S-0227	34	IJKLMN	64	A	2	3a	18	IJKLMNOPQRSTU
Amadeus 77	34	IJKLMN	56	QR	1	2a	15	NOPQRSTU
CENTA					2	2b		
Nahuat	34	IJKLMN	61	DEFG			17	KLMNOPQRSTU
CENTA					2	2b		
Chaparrastique	34	IJKLMN	64	DEFG			18	JKLMNOPQRSTU

* Medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (P>0.95).

[β] Ver Cuadro 4.

[ɤ] Color de la flor

1. blanco 2. lila 3. morado

[ε] Color del grano

1. blanco limpio
9. café
12. rosado
13a. Rojo claro
13ab. Rojo claro moteado
13b. Rojo intermedio
13c. Rojo oscuro
14a. Morado
14b.morado moteado
15. negro

Código	N° semillas por vaina	Peso seco 100 semillas (g)[ɔ]	Humedad grano (%)	Color de grano[ε]	Rendimiento (g/p)	
F-0009	6 CDE *	19.7	19.6	12	17	PQRSTUVWX
F-0022	7 AB	16.4	13.8	13a	21.5	KLMNOPQRSTUVW
F-0026	7 ABC	16.5	12.8	13a	20.5	LMNOPQRSTUVWX
F-0030	7 ABC	15.7	14	13b	13	WX
F-0034	6 BCD	15.3	18.2	13a	14	UVWX
F-0047	7 ABC	15.2	22	12	22.5	IJKLMNOPQRSTUVW
F-0057	6 BCD	20.5	11.9	13a	25.5	GHIJKLMNOPQRS

F-0072	8	A	19	17.2	12	26	GHIJKLMNOPQR
F-0077	6	CDE	18.4	13.2	13b	19	NOPQRSTUVWX
F-0079	7	ABC	13.3	16	13a	17	PQRSTUVWX
F-0080	6	BCD	16.7	12.3	13c	19.5	MNOPQRSTUVWX
F-0085	7	AB	16.6	15.5	12	27	FGHIJKLMNOPQ
F-0091	8	A	17.3	16.4	12	20.5	LMNOPQRSTUVWX
F-0097	7	AB	13.2	23.8	13a	15.5	RSTUVWX
F-0102	7	ABC	16.8	16.8	13b	13	WX
F-0104	6	CDE	18.4	13.6	13c	18	OPQRSTUVWX
F-0107	7	AB	15.4	16.8	12	23	HIJKLMNOPQRSTUVW
F-0117	8	A	19.1	13.2	13c	41	BC
F-0126	7	ABC	20.4	16.5	15	37	BCDEF
F-0130	6	BCD	16.2	13	13a	27	FGHIJKLMNOPQ
F-0147	6	BCD	17.9	13.8	13a	23	HIJKLMNOPQRSTUVW
F-0134	6	CDE	18.5	14.4	13a	24	GHIJKLMNOPQRSTUV
F-0155	7	AB	16	16.9	13c	28	EFGHIJKLMNO
F-0162	7	ABC	18.8	14.6	13a	26	GHIJKLMNOPQR
F-0169	6	BCD	19	17.5	15	32.5	BCDEFGHIJ
F-0190	6	CDE	17	13.7	13a	20	LMNOPQRSTUVWX
F-0201	6	BCD	17.6	20.8	12	20.5	LMNOPQRSTUVWX
F-0211	7	AB	20.8	14.6	13b	38.5	BCDE
F-0218	6	BCD	18.1	13.5	13a	21	KLMNOPQRSTUVWX
F-0245	5	DE	19.6	20	14a	15.5	RSTUVWX
F-0253	6	BCD	19.1	16	15	10.5	X
F-0264	6	BCD	16.6	15.1	15	16.5	QRSTUVWX
F-0321	7	ABC	13.7	18.8	13b	16.5	QRSTUVWX
F-0326	6	CDE	17.7	14.6	13b	20	LMNOPQRSTUVWX
F-0332	7	AB	19	13.9	12	27.5	FGHIJKLMNOP
F-0340	7	ABC	17.9	14.9	12	21.5	KLMNOPQRSTUVW
F-0386	6	ABC	17.4	16	13a	31.5	BCDEFGHIJK
F-0371	7	BCD	18.6	15.8	14b	30	DEFGHIJKLM
F-0405	7	AB	14.6	13.3	13c	27.5	FGHIJKLMNOP
F-0419	7	ABC	16.7	15.7	13a	28	EFGHIJKLMNO
F-0421	7	ABC	15.2	12.9	13a	24	GHIJKLMNOPQRSTUV
F-0428	6	CDE	15.9	16.2	13a	22	JKLMNOPQRSTUVW
F-0505	6	BCD	16.8	20.6	13a	16	RSTUVWX
F-0518	6	BCD	25	17.5	1	42	B
S-0037	6	BCD	18.6	15	15	14	UVWX
S-0040	6	CDE	17.8	15.8	12	17	PQRSTUVWX
S-0055	7	AB	19.2	16.4	9	19	NOPQRSTUVWX
S-0056	6	BCD	16.9	15	13a	14	UVWX
S-0061	6	BCD	19.5	13.8	12	13.5	VWX
S-0064	6	BCD	21.3	14.4	12	17.5	OPQRSTUVWX
S-0065	6	CDE	16.4	14.2	15	14.5	TUVWX

S-0066	5	DE	20.4	15.6	12	14	UVWX
S-0069	6	BCD	16.8	16.4	12	16.5	QRSTUVWX
S-0071	7	AB	19.5	11.3	13a	33	BCDEFGHI
S-0072	7	ABC	15.2	13.8	13a	15.5	RSTUVWX
S-0078	7	ABC	20.2	13.1	13b	25	GHIJKLMNOPQRST
S-0079	6	CDE	15.5	18.2	14b	13	WX
S-0084	6	BCD	16.6	15	13a	16.5	QRSTUVWX
S-0091	7	ABC	17.7	13.8	12	26	GHIJKLMNOPQR
S-0097	6	CDE	16.8	18.8	14b	10.5	X
S-0098	5	DE	18	14.6	13a	14.5	TUVWX
S-0112	7	ABC	18.3	20.7	12	42	B
S-0115	7	AB	19.3	12	13ab	21	KLMNOPQRSTUVWX
S-0116	7	AB	17.4	17.4	13a	18.5	NOPQRSTUVWX
S-0117	7	AB	20.3	19.9	9	29	EFGHIJKLMN
S-0128	7	ABC	17.2	14.5	12	18	OPQRSTUVWX
S-0130	7	ABC	25.3	17.2	12	33.5	BCDEFGH
S-0132	6	BCD	16.6	14.6	13b	14	UVWX
S-0133	7	ABC	18.5	12.8	13ab	28	EFGHIJKLMNO
S-0136	7	ABC	18.7	16.7	15	30.5	CDEFGHIJKL
S-0137	6	BCD	15.4	14.8	12	14	UVWX
S-0144	6	BCD	16.6	15	13a	18.5	NOPQRSTUVWX
S-0145	7	AB	14.4	23.4	15	15	STUVWX
S-0147	7	ABC	22.2	23	12	40	BCD
S-0151	7	ABC	19.3	24	15	22	JKLMNOPQRSTUVW
S-0157	7	ABC	18	19.7	12	58	A
S-0158	7	ABC	20.6	13.6	13a	34.5	BCDEFG
S-0165	7	ABC	15.1	13.6	13a	13	WX
S-0167	6	BCD	18.1	16	13a	19	NOPQRSTUVWX
S-0169	6	CDE	19.8	16	13b	17.5	OPQRSTUVWX
S-0170	7	ABC	18.6	13.2	15	19.5	MNOPQRSTUVWX
S-0171	6	BCD	17.2	17.1	15	17.5	OPQRSTUVWX
S-0173	6	CDE	15.7	12.2	12	13	WX
S-0174	6	BCD	18.8	12.2	13a	20	LMNOPQRSTUVWX
S-0184	6	BCD	20.1	13.2	13c	26	GHIJKLMNOPQR
S-0196	6	BCD	15.9	15.7	14b	15	STUVWX
S-0197	5	E	25.4	15.4	12	13	WX
S-0198	6	BCD	24	24.6	12	21	KLMNOPQRSTUVWX
S-0201	6	BCD	15.6	19	1	14.5	TUVWX
S-0203	6	BCD	20.5	20.4	15	27	FGHIJKLMNOPQ
S-0211	7	ABC	15.8	26	13a	21	KLMNOPQRSTUVWX
S-0214	7	ABC	20.8	19	12	28	EFGHIJKLMNO
S-0224[v]	-		-	-	-	-	
S-0227	6	BCD	17.5	15.4	13b	18	OPQRSTUVWX
Amadeus 77	7	ABC	18	15	13a	16.5	QRSTUVWX

CENTA Nahuat	7	AB	19.9	14	13a	24.5	GHIJKLMNOPQRSTU
CENTA Chaparrastique	6	BCD	21.2	13.6	13a	22.5	IJKLMNOPQRSTUVW

* Medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (P>0.95).
ə Peso seco en 100 semillas medido al 14% de humedad
ʏ No presentó floración

Anexo 5. Aplicaciones de productos agrícolas para el control de malezas, plagas y enfermedades en la parcela de la caracterización fenotípica de las accesiones de El Salvador y Honduras.

Producto	**Ingrediente activo**	**Cantidad (bomba de 25 lt)**	**Fecha de aplicación**	**Control**
Amistar	Azoxistrobin	10.5 g	26/06/2014	fungicida
Agrimycin	Estreptomicina+Oxitetraciclina	50 g	26/06/2014	bactericida
Perfekthion	Dimetoato	40 cc	26/06/2014	insecticida
Karate	Lambda-Cyhalothrin	46 ml	27/06/2014	insecticida
Flex	Fomesafen	55 cc	30/06/2014	herbicida
Fusilade	Fluazifop-p-butil	100 cc	30/06/2014	herbicida
Amistar	Azoxistrobin	10.5 g	11/07/2014	fungicida
Agri-gem	Tetraciclina	30 g	11/07/2014	insecticida
Tionex	Endosulfan	100 cc	11/07/2014	insecticida
Agri-gem	Tetraciclina	30 g	17/07/2014	insecticida
TryClan	Thiocyclan hidrogen oxalate	40 g	17/07/2014	mosca blanca
Amistar	Azoxistrobin	10.5 g	17/07/2014	fungicida

Anexo 6. Escala de evaluación para describir el hábito de crecimiento (CIAT 1993)