

Caracterización Molecular y Morfológica de Accesiones de Germoplasma de Frijol Común de El Salvador

**José Vladimir Hernández Monterroza
Melvin Alexander Amaya Rivera**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2013

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Caracterización Molecular y Morfológica de Accesiones de Germoplasma de Frijol Común de El Salvador

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

Presentado por

José Vladimir Hernández Monterroza
Melvin Alexander Amaya Rivera

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2013

Caracterización Molecular y Morfológica de Accesiones de Germoplasma de Frijol Común de El Salvador

Presentado por:

José Vladimir Hernández Monterroza
Melvin Alexander Amaya Rivera

Aprobado:

Juan Carlos Rosas, Ph. D.
Asesor principal

Renan Pineda, Ph. D.
Director
Departamento de Ciencia y
Producción Agronómica

Sindy Lagos, Ing. Agr.
Asesor

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Caracterización molecular y morfológica de accesiones de germoplasma de frijol común de El Salvador

José Vladimir Hernández Monterroza
Melvin Alexander Amaya Rivera

Resumen: El cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en El Salvador y el resto de la región centroamericana está sujeto al impacto de factores bióticos y abióticos que limitan su productividad. El mejoramiento de la resistencia a enfermedades al igual que la tolerancia a sequía, altas temperaturas y la baja fertilidad de los cultivos se fundamenta en la disponibilidad de genes deseables que pueden encontrarse en la diversidad genética del cultivo. El CENTA de El Salvador cuenta con una colección de frijol común compuesta por 230 accesiones, de las cuales la diversidad necesita ser evaluada para determinar su potencial como recurso genético. Para el presente estudio, una colección núcleo de 50 accesiones fue caracterizada molecularmente utilizando 12 cebadores con la técnica RAPD (siglas en inglés de Amplificaciones Randomizadas de Polimorfismos de ADN) en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. Esta caracterización generó 88 polimorfismos los cuales se agruparon en cuatro conglomerados de acuerdo a su similaridad genética usando el Coeficiente de Dice. Estos grupos resultaron ser significativamente diferentes con una $p < 0.05$ según la prueba de Hotelling. Adicionalmente se evaluaron características morfológicas del tamaño, forma y color de la semilla, color de la flor y hábito de crecimiento de las accesiones, lo que permitió determinar las variaciones entre ellas.

Palabras clave: Colección núcleo, marcadores RAPD, *Phaseolus vulgaris* L., similaridad genética.

Abstract: Cultivation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in El Salvador and the rest of Central America is subjected to the impact of biotic and abiotic factors that limit productivity. Improvement of disease resistance as well as tolerance to drought, high temperatures and low fertility is based on the availability of desirable genes which can be found in the genetic diversity of the crop. CENTA in El Salvador holds a common bean collection consisting of 230 accessions, of which the genetic diversity needs to be evaluated to determine their potential as gene sources. In the present study, a core collection of 50 accessions were molecularly characterized using 12 RAPD markers (Random Amplified Polymorphic DNA) at the Panamerican Agricultural School, Zamorano, Honduras. This characterization generated 88 polymorphisms which grouped the accessions into four clusters according to their genetic similarity using the Dice coefficient. The groups were significantly different at a $p < 0.05$ according to the Hotelling test. Additionally, morphological characteristics such as size, shape and seed color, flower color and growth habit were evaluated in the core collection, which allowed determining the variations between the accessions.

Keywords: Core Collection, genetic similarity, RAPD markers, *Phaseolus vulgaris* L.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4. CONCLUSIONES	15
5. RECOMENDACIONES	16
6. LITERATURA CITADA.....	17
7. ANEXOS	20

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Accesiones del genero <i>Phaseolus</i> del Banco de Germoplasma del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Cordova” de El Salvador utilizadas en el estudio.	4
2. Cebadores (primers) usados para identificar los marcadores RAPD en 50 accesiones criollas y cinco variedades mejoradas de frijol común <i>Phaseolus vulgaris</i> L. de El Salvador.	6
3. Prueba de variables múltiples de Hotelling.	9
4. Representación de las agrupaciones de las accesiones en el dendrograma.	10

Figuras	Página
1. Gel de electroforesis del marcador RAPD OPO-13 mostrando la escalera molecular (EM) y las bandas o polimorfismos de ADN generados en 21 accesiones de frijol común <i>Phaseolus vulgaris</i> L. de El Salvador. Zamorano, Honduras, 2013.	7
2. Polimorfismos detectados mediante marcadores RAPD en la evaluación molecular del germoplasma salvadoreño de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	8
3. Dendrograma de las similitudes genéticas de 50 accesiones criollas y 5 variedades mejoradas de germoplasma de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. de El Salvador según el Coeficiente de Dice. Grupo 1 (rojo), grupo 2 (azul), grupo 3 (café) y grupo 4 (verde).	11
4. Análisis de coordenadas principales para las agrupaciones (conglomerados) de las accesiones del germoplasma salvadoreño de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	12
5. Diferenciación por color de las 50 accesiones criollas.	12
6. Distribución de formas de la semilla de las accesiones criollas.	13
7. Diferencias en color de la flor de las accesiones criollas de El Salvador. Foto proporcionadas por el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Cordova” (CENTA), El Salvador.	13

1. Extracción de ADN para el análisis RAPD método de la Universidad de Wisconsin (UW)- Madison, Adaptado por Laboratorio de Biotecnología Aplicada de Zamorano.....	20
2. Reactivos y cantidades usadas para la PCR con marcadores tipo RAPD, tamaño de banda: NO definido.	21
3. Perfil térmico para la PCR, con sus respectivas temperaturas y tiempos y total de ciclos.....	21

1. INTRODUCCIÓN

El segundo grano básico de mayor consumo en la región de Centroamérica es el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), el cual forma parte de la alimentación diaria de la mayoría de la población. Adicionalmente, el frijol es un grano de gran importancia para el desarrollo de la economía salvadoreña por las exportaciones de productos nostálgicos a Estados Unidos, elaborados a base de maíz y frijol (IICA-Proyecto Red SICTA 2007).

Para la mayoría de la población salvadoreña el frijol común constituye un componente esencial de la canasta básica familiar y de la dieta diaria por ser considerado una fuente económica de proteínas (CENTA 2010). En El Salvador el consumo de proteínas solamente alcanza 54 gramos por persona por día, de las cuales se estima que 4.2 gramos son provenientes del frijol (FAO 2002), o sea que este cereal suministra el 8% de la disponibilidad total de proteínas.

Existen dos grandes reservas genéticas de las accesiones silvestres y cultivadas de frijol común: la mesoamericana, que tiene su origen desde México, América Central hasta Colombia, y la región andina del sur de Perú, Bolivia y el norte de Argentina (Koenig y Gepts, 1989). El conocimiento de la variabilidad genética es de vital importancia para identificar fuentes de mejoramiento amplias y diversas. El éxito dependerá de la habilidad para incorporar la diversidad genética y lograr una mayor ganancia en los caracteres de valor agronómico (Cornide 2002).

La diversidad genética de los cultivos puede ser evaluada a través de la variabilidad morfológica, química y molecular. Esta última consiste en usar marcadores moleculares de ADN para analizar la variabilidad genética en cultivos de gran importancia como es el de frijol. Los marcadores moleculares relacionados a una característica específica son de particular interés porque permiten identificar las variedades que tengan esa característica y diferenciarlos entre sí, es decir brindar información sobre la diversidad genética (Velasco Moreira 2005).

El empleo de marcadores moleculares ha significado un gran adelanto en la generación de mapas genéticos, las cuales brindan información sobre la estructura genómica. Debido a esto, el uso de marcadores moleculares se considera una de las diez tecnologías de mayor impacto en la primera década del siglo XXI (FAO 2010).

En un periodo de 7000 a 8000 años y con mucha influencia de las fuerzas evolutivas, deriva genética, migración, mutación y selección practicada por el hombre, el frijol común ha transitado desde la forma silvestre de hábito trepador y semillas pequeñas distribuida

en las tierras altas de Mesoamérica y la Zona Andina, a la forma actual que se siembra en un amplio rango de sistemas de producción y ambientes (Gepts y Debouck 1991).

Los polimorfismos morfológicos, fisiológicos, características agronómicas y moleculares también existen entre las formas cultivadas o domésticas, esto es probablemente debido a diferentes poblaciones de frijoles silvestres que participaron en las domesticaciones iniciales en las diferentes regiones (Singh *et al.* 1991), lo que lleva a la importancia del estudio morfológico de una especie domesticada, por medio de la identificación de ciertos criterios en el desarrollo de la planta.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Material experimental. Se experimentó con una colección núcleo de 50 accesiones criollas y cinco variedades mejoradas del Banco de Germoplasma del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) “Enrique Álvarez Cordova”, El Salvador. La colección núcleo de 50 accesiones se conformó considerando como criterios de selección sus características agronómicas y la localización y altitud (msnm) de las zonas de recolección. Las cinco variedades comerciales, son las que actualmente más se cultivan en el país.

Siembra. La siembra del material seleccionado se realizó en los invernaderos del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) de Zamorano. A los 15-20 días después de la siembra (DDS) se procedió a la recolección de muestras de tejido para la extracción de ADN de las diferentes accesiones.

Extracción de ADN. La extracción, cuantificación, dilución, amplificación y separación de ADN, se realizó según los protocolos del método de extracción de ADN para el análisis de RAPD (Método de la Universidad de Wisconsin, UW-Madison) adoptado por el Laboratorio de Biotecnología Aplicada de Zamorano.

La cosecha del tejido fresco de plantas debe de ser de 6-8 mitades de hojas jóvenes. A la muestra de tejido se agrega 50 μ l de buffer de extracción PEX (etil xantogenato de potasio), en un tubo para micro centrifuga Eppendorf de 1,5 ml. Macerar el tejido con una barra (pestle) de plástico y agregar 450 μ l de buffer PEX. Seguidamente las muestras deben ser sometidas a 65 °C a baño maría durante 30-60 minutos, y luego se deben centrifugar a 14,000 revoluciones por minuto (RPM) durante 10 segundos. El sobrenadante se transfiere a un tubo limpio de 1.5 ml, llenando los tubos con 1000 μ l de una mezcla de 6:1 de etanol: acetato de amonio 7.5 M para la precipitación de los ácidos nucleicos durante 30 minutos. Para peletizar los ácidos nucleicos se centrifugan a 3,000 RPM durante 10 minutos. La desnaturalización del ARN se da al agregar 300 μ l de ARNasa (100 μ g/ml) por una hora. La precipitación del ADN se realiza llenando los tubos con una mezcla de 10:1 de etanol: acetato de sodio 3 M, invirtiendo los tubos y permitiendo que se precipite a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego se centrifuga la muestra a 3,000 RPM por 5 minutos para peletizar el ADN y romper el precipitado; luego se vacía el etanol/acetato de sodio y se llenan los tubos conteniendo los pellets con etanol 70% para lavar y agitar manualmente. Enseguida se centrifuga a 14,000 RPM durante 15 segundos y se deja secar las muestras durante 12 horas. La rehidratación de los pellets se realizará agregando 100-200 μ l de buffer TE 0.1 X para disolverlos y colocando los tubos a 65 °C a baño maría.

Cuadro 1. Accesiones del genero *Phaseolus* del Banco de Germoplasma del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Cordova” de El Salvador utilizadas en el estudio.

Código	Variedad	Departamento	Latitud	Longitud
F-0037	Negro Tineco	Sonsonate	13°44'09.8'	89°49'26.2'
F-0040	Vaina de Pito	Sonsonate	13°45'49.6'	89°56'02.1'
F-0055	Pando	La Paz	13°30.538'	88°50.879'
F-0056	Vicentino	La Paz	13°30.740'	88°50.847'
F-0061	Pando	San Vicente	13°39.706'	88°52.450'
F-0064	Tongoloy	San Vicente	13°39.959'	88°52.187'
F-0065	Cuarenteño Negro	San Vicente	13°39.764'	88°52.942'
F-0066	Sedon	San Vicente	13°38.157'	88°46.651'
F-0069	Vaina blanca	San Vicente	13°40.092'	88°50.847'
F-0071	San Juan	Cabañas	13°47.892'	88°53.586'
F-0072	Seda Cuarenteño rojo	Santa Ana	14°03'26.9'	89°40'27.4'
F-0078	Chema	La Union	13°17.499'	87°52.300'
F-0079	Colocho o Cuarentano	La Union	13°15.476'	87°55.053'
F-0084	Sangre de Toro	La Union	13°15.390'	87°55.117'
F-0091	Seda Rosado Grueso y San Francisco	San Miguel	13°26.969'	88°13.391'
F-0097	Pinto o Quilite	Usulután	13°25.208'	88°32.713'
F-0098	Rojo de Seda	La Libertad	13°47'52.9'	89°06'34.2'
F-0112	Seda de Gajo	Cabañas	13°52.459'	88°39.615'
F-0115	Panza de Rana	Ahuachapán	14°01.540'	89°47.028'
F-0116	Seda Catracho Rojo	Ahuachapán	14°01.540'	89°47.028'
F-0117	Naranja	Ahuachapán	14°01.540'	89°47.028'
F-0128	Lilon Seda	Santa Ana	13°49.304'	89°30.425'
F-0130	Sedón (vaina morada)	Sonsonate	13°44.462'	89°27.539'
F-0132	Rojo Pantaleón	La Libertad	13°47'44.4'	89°27'27.3'
F-0133	Cuarenteño Rojo Saradito	Sonsonate	13°42.285'	89°39.406'
F-0136	Tineco Negro (vaina morada)	Sonsonate	13°42.285'	89°39.406'
F-0137	Juan Diaz	Sonsonate	13°42.125'	89°39.432'
F-0144	Sedón	Ahuachapán	13°58'36.9'	89°43'38.3'
F-0145	Sedita	Sonsonate	13°45'04.1'	89°56'05.1'
F-0147	Seda Pálido	Sonsonate	13°52'11"	90°01'44"
F-0151	Tineco Vaina Morada	Sonsonate	13°45'59.8"	89°46'42.3"
F-0157	Sedita	Santa Ana	14°08'29.0"	89°32'02.84"
F-0158	Frijol Seda Chapin	Santa Ana	14°14'27.53"	89°28'21.60"
F-0165	Rojito	Chalatenango	14°07'10.94"	89°21'27.35"
F-0167	Frijol Quiliete Rojo	Ahuachapán	13°45'06.75"	89°56'04.38"
F-0169	Sedita	Ahuachapán		
F-0170	Huizucar	Ahuachapán		
F-0171	Quiliete Negro	Ahuachapán	13°45'52.80"	089°56'02.17"

Código	Variedad	Departamento	Latitud	Longitud
F-0173	Frijol Lila	Ahuachapan	13°46'30.03"	089°55'02.93"
F-0174	Catrachito	Santa Ana	14°02'32.28"	089°36'56.89"
F-0184	Sangre de Toro	Santa Ana	14°07'14.22"	089°39'24.75"
F-0196	Negro Cuarenteño	Ahuachapan	13°58'33.36"	089°46'32.33"
F-0197	Seda Beliceño	Ahuachapan	14°01.540'	89°47.028'
F-0198	Seda Costarricense	Ahuachapan	14°01.540'	89°47.028'
F-0201	Blanco de Matocho	Ahuachapan	13°62'50.34"	89°55'54.44"
F-0203	Negro Porrillo	Ahuachapan	13°62'50.34"	89°55'54.44"
F-0211	Chacalin	Ahuachapan	13°51'33.84"	90°00'49.93"
F-0214	Lila Vaina Morada	La Libertad	13°44'03.12"	89°27'57.40"
F-0224	Frijolón	Cuzcatlan	13°41'36.02"	88°57'01.57"
F-0227	Vaina Blanca	Cuzcatlan	13°41'36.02"	88°57'01.57"
	CENTA 2000	Variedad Comercial		
	CENTA Pipil	Variedad Comercial		
	CENTA CPC	Variedad Comercial		
	CENTA Nahuat	Variedad Comercial		
	CENTA San Andrés	Variedad Comercial		

Cebadores para PCR. A las muestras de ADN de cada variedad en estudio 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, Promega (5 u/µl) y 7,5 µl de ADN (10 ng/ml), para un total de 15 µl por reacción. La PCR se realiza con un protocolo de desnaturalización inicial a 95 °C durante un minuto, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 45 segundos, acoplamiento a 35 °C por 30 segundos, extensión a 72° C durante un minuto 15 segundos, una extensión al final de los 35 ciclos a 72 °C por cinco minutos, y mantenimiento y enfriado a 15 °C por tiempo indefinido (Cuadro 2).

El producto de la PCR sometido a electroforesis (Figura 1) fue analizado para cada uno de los marcadores (12 RAPD en total). En las fotografías se tomó en cuenta la presencia o ausencia de bandas polimórficas a las cuales se les asignaba un valor binario (1=presencia de la banda y 0=ausencia de la banda). Mediante el análisis de todas las fotografías se obtuvo una matriz de datos la cual se utilizó posteriormente para realizar el análisis estadístico.

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 de electroforesis. Las bandas fueron separadas a 110 Voltios durante 1 h 30 min, luego de terminar su tiempos se procedió a ser teñidas en una solución 1:10 de bromuro de etidio durante 20 minutos y agua destilada durante 15 min para lavar excesos de

bromuro de etidio. Luego se visualizaron las bandas de ADN obtenidas en un transiluminador Benchtop UVP, y fotografía bajo luz ultravioleta (Figura 1).

Cuadro 2. Cebadores (primers) usados para identificar los marcadores RAPD en 50 accesiones criollas y cinco variedades mejoradas de frijol común *Phaseolus vulgaris* L. de El Salvador.

N°	Cebador	Secuencia
1	OPA-02	5' TGCCGAGCTG 3'
2	OPB-10	CTGCTGGGAC
3	OPB-15	GGAGGGTGTT
4	OPC-04	CCGCATCTAC
5	OPQ-14	GGACGCTTCA
6	OPU-19	GTCAGTGCGG
7	OPV-10	GGACCTGCTG
8	OPH-20	GGGAGACATC
9	OPI-16	TCTCCGCCCT
10	OPH-08	GAAACACCCC
11	OPO-13	GTCAGAGTCC
12	OPD-05	TGAGCGGACA

Análisis. Para el análisis estadístico multivariado se utilizó el paquete estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2013). La similitud y distancia genética de las accesiones analizadas con RAPD se determinó a través de un Análisis de Correspondencia mediante el índice de Dice, utilizado para datos cualitativos. Se elaboró un dendrograma para establecer la agrupación a la que pertenecen las accesiones, este se realizó mediante un análisis de conglomerados utilizando el coeficiente o índice de similaridad de Dice (1945).

Adicionalmente, se realizó el análisis estadístico mediante la prueba T de variables múltiples de Hotelling ($\alpha= 0.05$), para determinar si existen diferencias estadísticas entre los conglomerados o grupos representados en el dendrograma (Hotelling 1951).

Análisis morfológico. La caracterización de los recursos fitogenéticos es una de la herramienta más útil para su aprovechamiento en el mejoramiento genético y su conservación (Vargas Vásquez *et al.* 2008). Las características morfológicas que se evaluaron en el estudio están más relacionadas con la flor, hábito de crecimiento y semilla.

Tipo de crecimiento. Para el crecimiento vegetativo se consideraron las características de hábito de crecimiento de la planta según lo propuesto por el CIAT (1993), la cual determina que el hábito de crecimiento está influenciado por varios factores ambientales.

Tipo de grano. El grano es una variable que se toma muy en cuenta para realizar mejoramiento en cualquier tipo de cultivo (Singh *et al.* 1991). Algunos caracteres morfológicos han permitido comparar la variabilidad genética que existen entre las

especies silvestres y cultivadas, algunas variables tales como: el hábito de crecimiento y tipo de semilla (color, tamaño y forma) (Lépiz Ildefonso *et al.* 2010).

La forma del grano es uno de los factores a evaluar en la caracterización morfológica. Según CIAT (1993), la forma de la semilla se determina longitudinalmente y se clasifica cualquier similitud en sus formas de la siguiente forma: 1= redonda, 2= ovoide, 3= elíptica, 4= pequeña, casi cuadrada, 5= alargada, ovoidea 6= alargada, ovoide en un extremo e inclinada en el otro (Rosas *et al.* 2009).

Color de flor. El frijol tiene una típica flor papilionácea de simetría bilateral. Los análisis que se le realizan a la flor siempre se toman una flor del racimo floral del cuarto nudo (CIAT 1993).

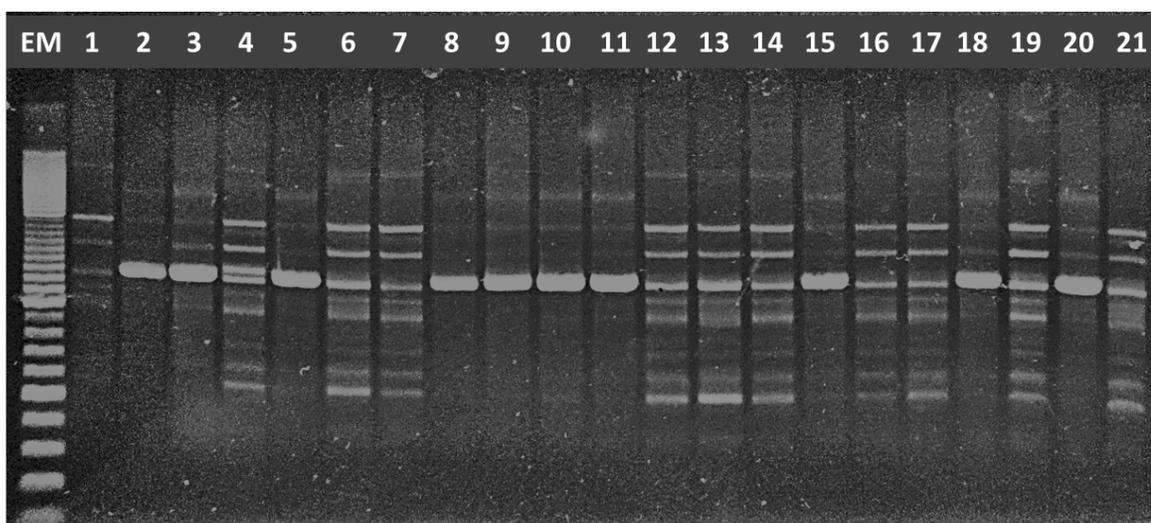


Figura 1. Gel de electroforesis del marcador RAPD OPO-13 mostrando la escalera molecular (EM) y las bandas o polimorfismos de ADN generados en 21 accesiones de frijol común *Phaseolus vulgaris* L. de El Salvador. Zamorano, Honduras, 2013.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis genético. El análisis molecular de las 50 accesiones criollas y 5 variedades mejoradas de *Phaseolus vulgaris* L. mediante la técnica RAPD usando 12 cebadores, permitió generar 88 bandas polimórficas de ADN. Los cebadores OPA-02 y OPB-15 fueron los que menos bandas polimórficas presentaron (tres bandas cada uno), mientras que el cebador que más bandas polimórficas presentó fue el OPU-19 con 17 bandas (Figura 2).

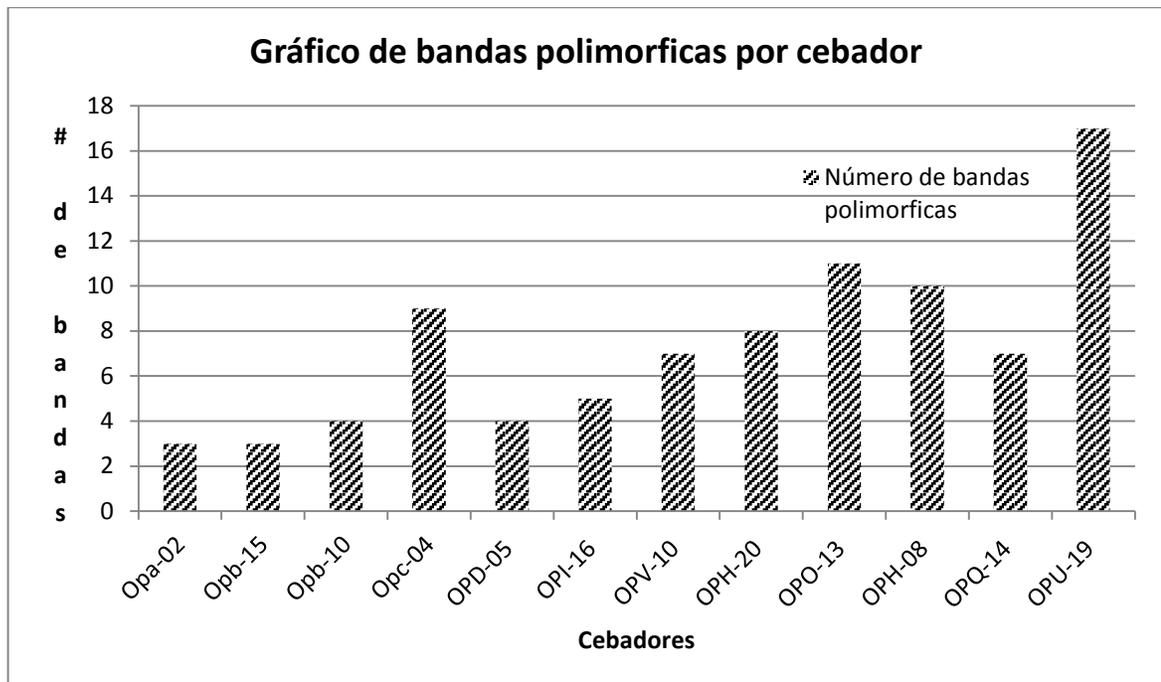


Figura 2. Polimorfismos detectados mediante marcadores RAPD en la evaluación molecular del germoplasma salvadoreño de *Phaseolus vulgaris* L.

La información obtenida mediante los cebadores se usó para generar un dendrograma utilizando el coeficiente de Dice (CD) o índice de similitud con el software InfoStat (Figura 3). En el dendrograma se identificaron cuatro grupos bien definidos, el grupo uno (color rojo) fue el más grande e incluyó 23 accesiones; el segundo (color azul) presentó 19 accesiones incluyendo a las variedades mejoradas CENTA Nahuat y CENTA Pipil; el grupo 3 (color café) agrupó ocho accesiones; y el grupo cuatro (color verde) agrupó cinco accesiones, entre ellas las variedades mejoradas CENTA San Andrés, CENTA CPC y CENTA 2000 (Cuadro 4).

Las accesiones criollas Pando y Sedita se encontraron repetidas con el mismo nombre dos y tres veces, respectivamente; pero, debido a que fueron colectadas en distintas zonas y altitudes de El Salvador se le asignó un número correlativo para diferenciarlas (Pando 1, Pando 2 y Sedita 1, Sedita 2, Sedita 3). La agrupación de estas accesiones en el dendrograma de las similitudes genéticas, fue en diferentes conglomerados. La accesión Pando 1 y Pando 2 en el grupo 1, la accesión Sedita 1 en el grupo 2, Sedita 2 en el grupo 1 y Sedita 3 en el grupo 4, junto a las variedades mejoradas CENTA San Andrés, CENTA CPC y CENTA 2000 con un CD de 0.83 (Figura 3). Esto nos indica que las accesiones identificadas con un mismo nombre común resultaron ser genéticamente diferentes según el análisis de similitudes genéticas de Dice.

El conglomerado 1 se separa marcadamente de los otros tres, con un CD de 2.45; los conglomerados 2 y 3 se separan del 4 con un CD de 1.68 y el conglomerado 2 se separa del 3 con un CD de 1.38. Las mayores diferencias genéticas se presentan en los grupos extremos 1 y 4. Dentro de cada conglomerado se distinguen agrupaciones entre accesiones, indicando que estas son menos similares al resto de su mismo conglomerado. En el análisis de coordenadas principales, se observa que el conglomerado 1 (cuadrante superior derecho) se diferencia marcadamente de los otros tres grupos. Los conglomerados 2 y 3 se separan del grupo 4 (cuadrante superior izquierdo) pero fueron más parecidos entre ellos, por lo tanto los grupos dos y tres a pesar de ser distintos pertenecieron al mismo cuadrante. Las accesiones aglomeradas dentro de cada grupo presentaron similitudes entre ellas (Figura 4).

El análisis estadístico realizado a través de la prueba de variables múltiples de Hotelling con $\alpha=0.05$, demostró que los cuatro grupos son estadísticamente diferentes (Cuadro 3).

Cuadro 3. Prueba de variables múltiples de Hotelling.

Conglomerados o Grupos	Numero de Accesiones[¥]	Letra[‡]
4 (verde)	5	A
3 (café)	8	B
2 (azul)	19	C
1 (rojo)	23	D

[‡] Conglomerados con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

[¥] Número de accesiones que se agruparon a cada conglomerado o grupo.

A pesar de que El Salvador cuenta con área territorial muy pequeña, la variabilidad genética encontrada en las 50 accesiones de frijol común indica la importancia de la diversidad genética en este germoplasma de frijol común. Al igual que en el estudio realizado por Rubio Medina (2002) sobre la caracterización de la diversidad genética del germoplasma hondureño de frijol común, se encontró que Honduras cuenta con una alta variabilidad genética en su germoplasma de frijol común. Herrera Dávila (2004) en su estudio de caracterización molecular del germoplasma cultivado y silvestre de frijol común de Honduras, también concluyó que existe una alta variabilidad genética en el germoplasma hondureño. Guachambala Cando y Rosas Sotomayor (2010), en la caracterización molecular de accesiones cultivadas y silvestres de frijol común de

Honduras, encontraron que el germoplasma de frijol silvestre es relativamente diferente al germoplasma de frijol cultivado. En un estudio de caracterización molecular con microsátelites de la colección guatemalteca de frijol común trepador, se identificaron 12 grupos o conglomerados según el análisis de similaridad y correspondencia, los cuales mostraron un alto grado de heterocigocidad (Ponciano Samayoa *et al.* 2009).

Cuadro 4. Representación de las agrupaciones de las accesiones en el dendrograma.

Grupo 1 (color rojo)	Grupo 2 (color azul)	Grupo 3 (color café)	Grupo 4 (color verde)
Vaina de Pito	Negro Tineco	Pando 1	Cuarenteño Negro
Pando 2	Vicentino	Vaina Blanca	Sedita 3
Tongoloy	Chema	Seda Rosado Grueso y San Francisco	CENTA 2000
Sedon	Sangre de Toro	Seda de Gajo	CENTA CPC
San Juan	Pinto o Quilite	Seda Catracho Rojo	CENTA SAN ANDRES
Seda Cuarenteño Rojo	Rojo de Seda	Lilon Seda	
Colocho o Cuarentano	Panza de Rana	Sedon (Vaina Morada)	
Juan Diaz	Naranja	Vaina Blanca	
Sedon	Rojo Pantaleon		
Seda Palido	Cuarenteño Rojo		
	Saradito		
Sedita 2	Tineco Negro (Vaina Morada)		
Frijol Seda Chapin	Sedita 1		
Rojito	Tineco Vaina Morada		
Frijol Quiliete Rojo	Quiliete Negro		
Huizucar	Catrachito		
Frijol Lila	Sangre de Toro		
Seda Beliceño	Negro Cuarenteño		
Seda Costarricense	CENTA PIPIL		
Blanco de Matocho	CENTA NAHUAT		
Negro Porrillo			
Chacalin			
Lila	Vaina		
Morada			
Frijolón			

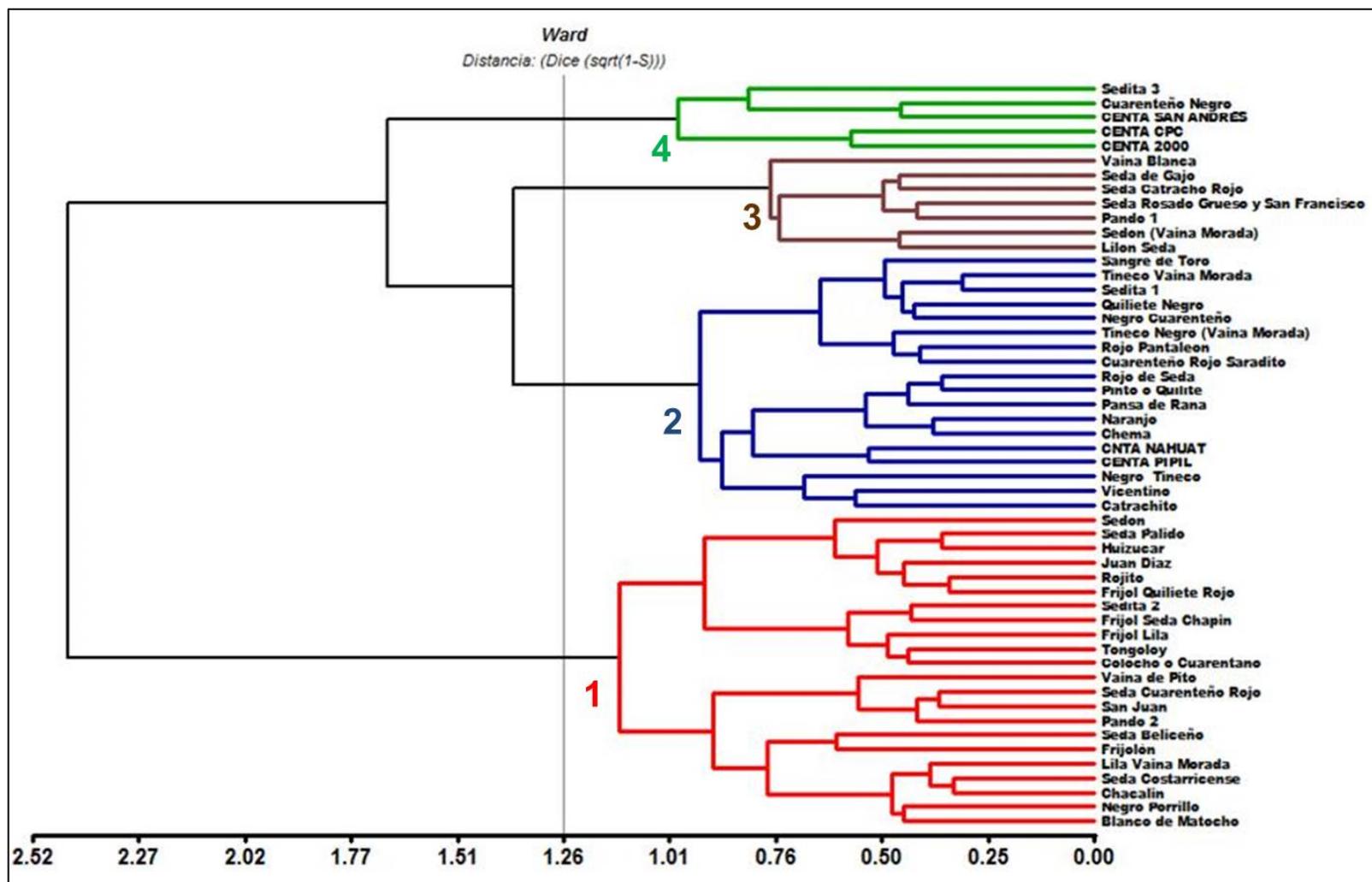


Figura 3. Dendrograma de las similitudes genéticas de 50 accesiones criollas y 5 variedades mejoradas de germoplasma de *Phaseolus vulgaris* L. de El Salvador según el Coeficiente de Dice. Grupo 1 (rojo), grupo 2 (azul), grupo 3 (café) y grupo 4 (verde).

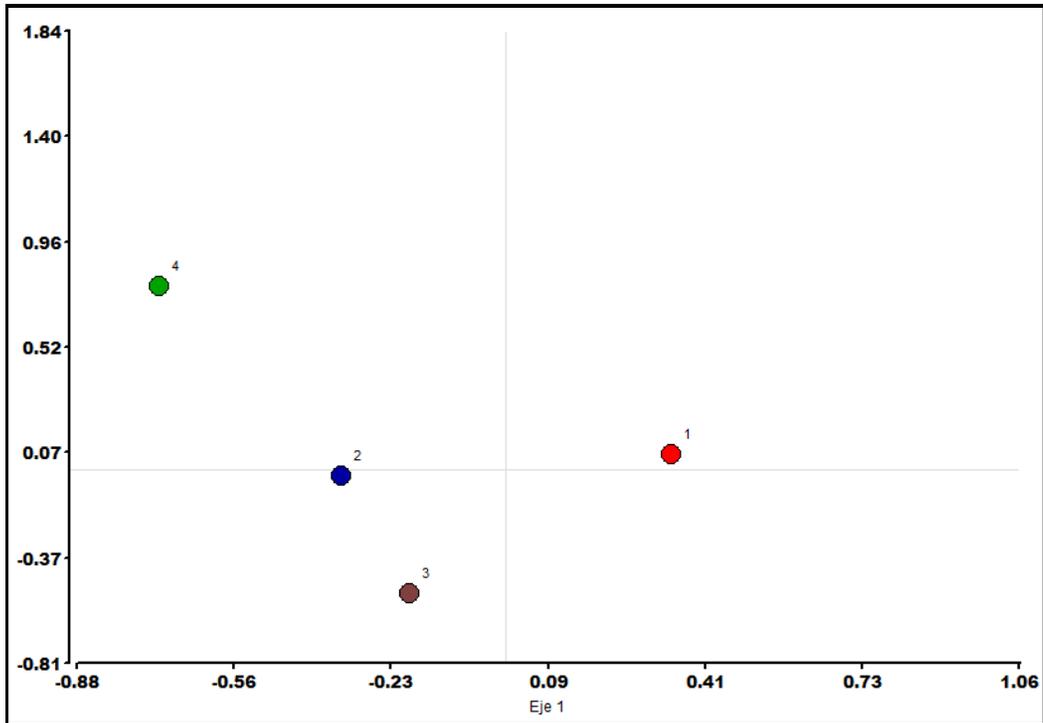


Figura 4. Análisis de coordenadas principales para las agrupaciones (conglomerados) de las accesiones del germoplasma salvadoreño de *Phaseolus vulgaris* L.

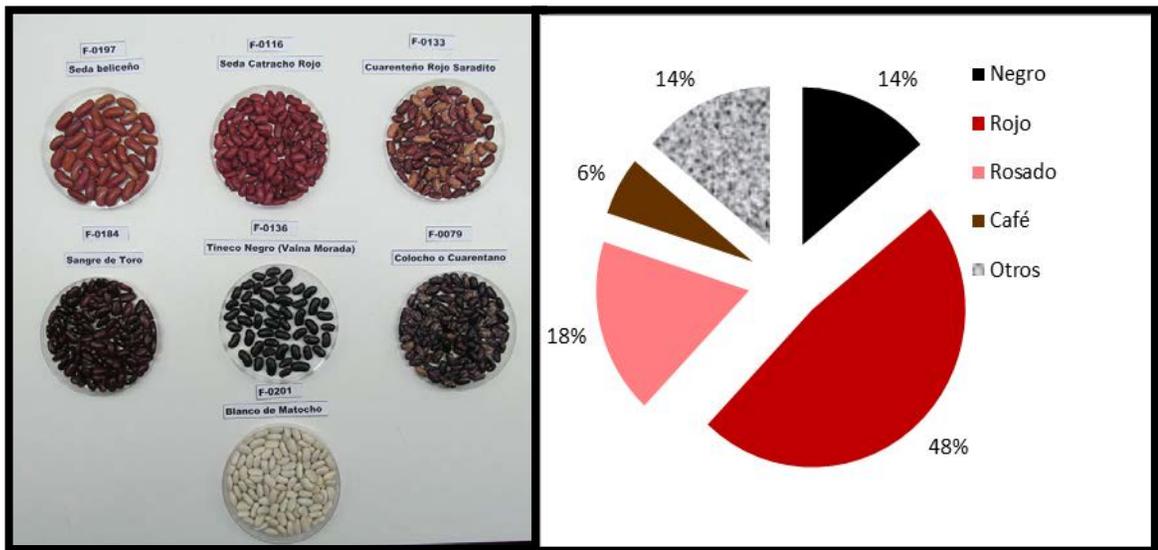


Figura 5. Diferenciación por color de las 50 accesiones criollas

Forma. Se determinó que la forma predominante de semilla de las accesiones criollas de El Salvador es la forma arriñonada, recta del lado del hilo (72%); mientras que un 24% de estas son alargadas, casi cuadradas y el 4% son ovoides. (Figura 6).

Peso de 100 semillas. Este es un componente del rendimiento. Los resultados indican que el promedio del peso de 100 semillas fue de 24.3 g, lo que indica que las semillas son de tamaño pequeño, el tamaño característico de la raza mesoamericana del acervo del mismo nombre.

Color de flor. Se determinó que el 66% de las accesiones poseen flores blancas; mientras que un 24% son de color lila y el resto son combinaciones de estos dos colores (Figura 7).

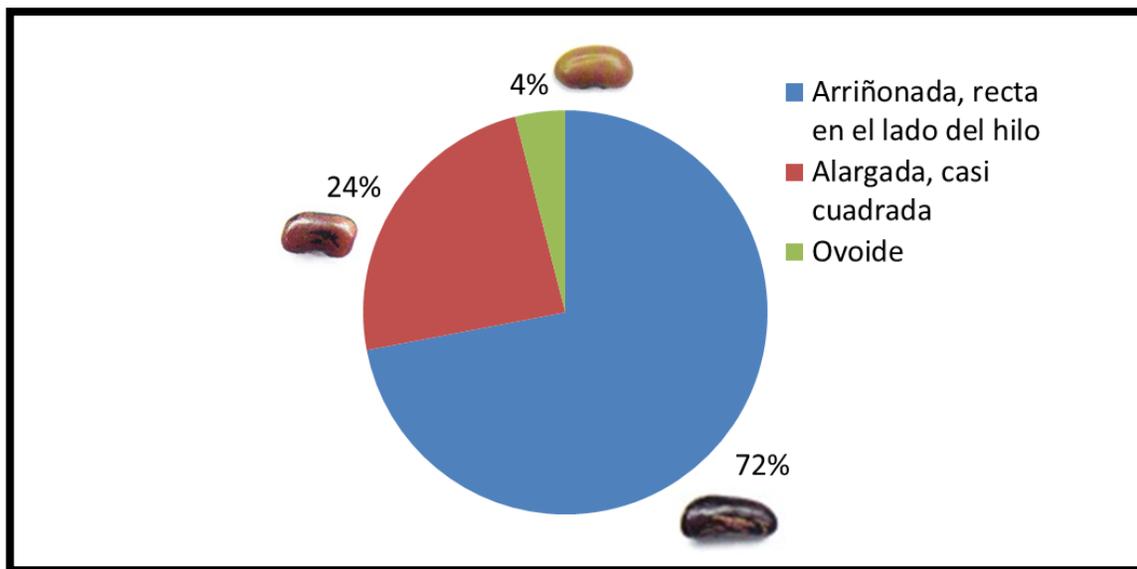


Figura 6. Distribución de formas de la semilla de las accesiones criollas.



Figura 7. Diferencias en color de la flor de las accesiones criollas de El Salvador. Foto proporcionadas por el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Cordova” (CENTA), El Salvador.

Habito de crecimiento. Para el crecimiento vegetativo se tomó en cuenta los hábitos de crecimiento propuestos por CIAT (1993), el cual nos indica que para las 50 accesiones criollas el más común es el tipo II (arbustivo indeterminado) y el tipo III (indeterminado, postrado o rastrero con habilidad para trepar).

La caracterización de los pocos caracteres morfológicos incluidos en este estudio, sugieren que la diversidad genética de El Salvador a pesar de su poca extensión es muy diversa. Los estudios realizados por Rubio Medina (2002) de la caracterización de la variabilidad genética del germoplasma hondureño de frijol común, demuestra ciertas similitudes con la caracterización de las 50 accesiones del germoplasma salvadoreño, los cuales demuestran que el frijol común hondureño presenta mayormente un crecimiento de tipo II, color de semilla roja y un peso de 100 semillas entre 22 – 25 g.

4. CONCLUSIONES

- El empleo de la técnica con marcadores RAPD permitió determinar que la colección núcleo de El Salvador presenta una gran diversidad genética, la cual está representada por cuatro conglomerados o grupos genéticos que son significativamente diferentes entre sí.
- El análisis de diversidad genética con los RAPD sugiere que la colección completa de 230 accesiones de El Salvador es igual o más diversa que la colección núcleo utilizada en el estudio, la cual sólo representa aprox. el 25% del total de la colección.
- La caracterización morfológica indicó una proporción mayor de accesiones de grano de color rojo, de forma arriñonada y de tamaño pequeño de semilla, y de hábitos de crecimiento tipos II y III.

5. RECOMENDACIONES

- Continuar la caracterización molecular de la colección núcleo de accesiones de frijol de El Salvador con un mayor número de cebadores RAPD para mejorar el análisis y las agrupaciones por similitud genética.
- Analizar las similitudes entre las colecciones núcleos de Honduras analizada en anteriores estudios y la de El Salvador, para conocer e interpretar su similitud y diferencias genéticas para fines de conservación y de mejoramiento genético.
- Evaluar las accesiones con marcadores SCAR disponibles en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada, para identificar accesiones con genes de resistencia a las enfermedades más importantes en frijol que puedan servir de fuentes de resistencia.

6. LITERATURA CITADA

- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Cordova”). 2010. Guía Técnica para el manejo de variedades de frijol. Programa de granos Básicos, El Salvador. 23 p .
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 1993. Descriptores varietales: arroz, frijol, maíz, sorgo. Ed. Por G. Muñoz, G. Giraldo y J. Fernández de Soto, Cali, Colombia. 174 p.
- Cornide, M. 2002. Marcadores Moleculares: nuevos horizontes en la genética y selección de las plantas. Edit. Félix Varela. La Habana, Cuba. 366 p.
- Dice LR. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26:297-302.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. y 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 zoogenéticos 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>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2002. Perfiles Nutricionales por Países – El Salvador (en línea). Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/ag/agn/nutrition/ncp/slv.pdf>
- Gepts P. and D. Debouck. 1991. Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Common Beans. Research for Crop Improvement. A van Schoonhoven, O Voysest . C.A.B. International. p.7-53.

- Guachambala, M.S. y Rosas, J.C. 2010. Caracterización Molecular de Acciones Cultivadas y Silvestres de Frijol Común de Honduras. *Agronomía Mesoamericana* 21(1):51-61.
- Herrera Dávila, B. 2004. Caracterización molecular del germoplasma cultivado y silvestre de frijol común de Honduras. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 32 p.
- Hotelling, H. 1951. A Generalized t test and measure of Multivariate Dispersion. *In* Neyman, J. ed. *Proceedings of the Second Berkeley Symposium on Mathematical Statistics*. University of California Press, Berkeley, USA. 19 p.
- 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.
- Koenig R. and P. Gepts. 1989. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of genetic diversity. *Theoretical and Applied Genetics* 78:809–817.
- Lépiz Ildelfonso, R. J. Lopez Alcocer, J. Sanchez Gonzales, F. Santacruz, R. Nuño Romero y E. Rodriguez Guzman, 2010. Características morfológicas de formas cultivadas, silvestres e intermedias de Frijol común de hábito trepador. *Rev. Fitotecnia Mexicana* vol. 33 (1): 21-28.
- Ponciano Samayoa, K.M., Villatoro Mérida, J.C. y Molina Monterroso, L.G. 2009. Caracterización preliminar con micro-satélites de la colección guatemalteca de frijol común trepador. *Agronomía Mesoamericana* 20(2):245-254.
- Rosas Sotomayor, J.C., Guachambala, M.S. y 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.
- Singh S. P., P. Gepts, y D.G. Debouck. 1991. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). 18 p.

- Vargas Vásquez, M. Muruaga Martínez, J. Pérez Herrera, P. Gill Langarica, H. Esquivel Esquivel, G. Martínez Damian, M. Rosales Serna, R. y Mayek Pérez, 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.
- Velasco Moreira, R. 2005. Marcadores moleculares y la extracción de ADN. Facultad de Ciencias Agropecuarias Vol 3. (en línea). Disponible en: <http://www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol3/Art32.pdf>

7. ANEXOS

Anexo 1. Extracción de ADN para el análisis RAPD 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 hijas jóvenes)
2. Agregar 50 μ l 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 μ l 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 maria 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 μ l de RNAasa A (concentración de 100 μ g/ml) + buffer TE^x 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 peletearlo. 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 2. Reactivos y cantidades usadas para la PCR con marcadores tipo RAPD, tamaño de banda: NO definido.

Reactivos	1X
dd H ₂ O	3.4 µl
PCR buffer	1.5 µl
dNTP's	1.5 µl
Primer	0.6 µl
Taq (Enzima)	0.5 µl
ADN Template	7.5 µl
Total	15.0 µl

Anexo 3. Perfil térmico para la PCR, con sus respectivas temperaturas y tiempos y total de ciclos.

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