

# CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ACCESIONES CULTIVADAS Y SILVESTRES DE FRIJOL COMÚN DE HONDURAS<sup>1</sup>

Marcelino Santiago Guachambala-Cando<sup>2</sup>, Juan Carlos Rosas-Sotomayor<sup>2</sup>

## RESUMEN

**Caracterización molecular de accesiones cultivadas y silvestres de frijol común de Honduras.** Para determinar la diversidad genética de las accesiones de *Phaseolus* que se conservan en el Banco de Germoplasma, un grupo de 69 accesiones de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y de *P. coccineus* de Honduras, fueron evaluadas con 30 cebadores mediante la técnica de marcadores moleculares RAPD (Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar), generándose 341 fragmentos polimórficos de ADN. Las distancias genéticas fueron determinadas según el coeficiente (o índice de similaridad) de Dice y el método UPGMA. Estos análisis moleculares identificaron dos grupos a partir de un coeficiente de Dice (CD) de 0,48, uno perteneciente a *P. vulgaris* y el otro a *P. coccineus*. Las accesiones de *P. vulgaris*, mostraron una división marcada (CD de 0,64) entre las pertenecientes a los reservorios andino y mesoamericano. Por otro lado, las accesiones mesoamericanas se separaron (CD de 0,76) en cuatro grupos, correspondientes a las accesiones silvestres, las variedades de la raza Jalisco, y las variedades mejoradas y criollas de la raza Mesoamérica. Los resultados confirmaron las distancias genéticas esperadas, incluyendo mayor distancia entre las especies de *Phaseolus*, seguidas de la separación entre las accesiones del reservorio andino y el mesoamericano de *P. vulgaris*. En el reservorio mesoamericano, las dos accesiones de la raza Jalisco presentaron menor similitud que las de la raza Mesoamérica, y dentro de la raza Mesoamérica, los silvestres separados de los cultivados; adicionalmente, las mejoradas relativamente diferentes a las criollas.

**Palabras clave:** *Phaseolus vulgaris*, *P. coccineus*, diversidad genética, marcadores RAPD.

## ABSTRACT

**Molecular characterization of cultivated and wild accessions of common bean from Honduras.** To determinate the genetic diversity of the *Phaseolus* collection maintained at Zamorano's Germplasm Bank, 69 accessions of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and *P. coccineus* from Honduras were evaluated with 30 primers using the RAPD (Randomized Amplified Polymorphic DNA) marker technique, generating 341 DNA polymorphic fragments. The study was conducted during 2008-09 in Zamorano; Honduras. The genetic distances were determined by the Dice coefficient (or similarity index) and the UPGMA method. These molecular analyses identified two groups at 0.48 Dice Coefficient (DC), one belonging to the *P. vulgaris* species and the other to *P. coccineus*. The group of *P. vulgaris* accessions shows a clear division (DC of 0.64) between the Andean and the Mesoamerican pools. In the other hand, the Mesoamerican accessions show a separation (DC of 0.76) of four groups corresponding to the wild accessions, the cultivars from the race Jalisco, and the improved and the landrace cultivars from the race Mesoamerica. The results confirmed the expected genetic distances, including a greater distance among the accessions of the two *Phaseolus* species, followed by a good separation of the accessions from the Andean and Mesoamerican *P. vulgaris* gene pools. At the Mesoamerican gene pool level, the two accessions from the Jalisco race are less similar from the accessions belonging to the Mesoamerican race; and within the Mesoamerican race, the wild are separated from the cultivated accessions; additionally, in the cultivated the improved are relatively different from the landrace accessions.

**Key words:** *Phaseolus vulgaris*, *P. coccineus*, genetic diversity, RAPD markers.

<sup>1</sup> Recibido: 2 de octubre, 2009. Aceptado: 17 mayo, 2010. Trabajo conducido como parte de las actividades de los proyectos de investigación auspiciados por el Programa Dry Grain Pulses CRSP (donación USAID No. EDH-A- 00-07-00005-00).

<sup>2</sup> Programa de Investigaciones en Frijol, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. mguachambala@zamorano.edu; jrosas@zamorano.edu

## INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es el segundo grano en el consumo alimenticio diario en los países centroamericanos (IICA-Proyecto Red SICTA 2007). En la mayoría de países de América Latina forma parte de alimentos tradicionalmente consumidos principalmente en las zonas rurales y las áreas urbanas pobres (Rosas *et al.* 2003). La gran diversidad de granos de distintos colores, formas y tamaños, permite la elaboración de una gran diversidad de recetas. El alto contenido de proteínas y minerales como el hierro, hacen del grano de frijol una fuente rica de nutrientes. 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.

El cultivo del frijol común se encuentra ampliamente distribuido geográficamente, y posee una gran adaptación a distintos ecosistemas, debido a su gran diversidad genética representada por tres razas mesoamericanas (Durango, Jalisco y Mesoamérica) y tres razas andinas (Chile, Nueva Granada y Perú) (Singh *et al.* 1991). Esta diversidad puede ser analizada con marcadores moleculares de ADN. La diversidad genética de los cultivos puede ser entendida de mejor manera usando la variación molecular, química y morfológica. Desde la aparición de las técnicas moleculares como los RFLP (Polimorfismos para Longitudes de Fragmentos de Restricción), RAPD y SCAR (Regiones Amplificadas y Caracterizadas por Secuencia), ha sido posible conocer la diversidad genética de diversos organismos.

Los marcadores RAPD han sido los más usados en análisis de germoplasmas debido a su fortaleza polimórfica (Skroch *et al.* 1992, Beebe y Pedraza 1998, Beebe *et al.* 2000). Entre más polimorfismos se identifiquen con la técnica de análisis RAPD, mayor es la capacidad de establecer relaciones genéticas; estos marcadores también permiten identificar QTL (Loci de Carácter Cuantitativo) ligados a la resistencia a enfermedades (Guimaraes *et al.* 2007). La técnica RAPD ha sido utilizada en estudios de caracterización de la diversidad genética de accesiones de germoplasma de frijol común provenientes de México (Skroch *et al.* 1998), Chile (Vera *et al.* 1999), Brasil (Caixeta y Alves 2001, Emygdio *et al.* 2003), Cuba (Miranda *et al.* 2006), Centro América (Beebe *et al.* 1995, Beebe *et al.* 2000) y El Caribe (Durán *et al.* 2005), entre otros.

La información genética de las accesiones cultivadas, criollas o mejoradas, o de sus progenitores, permite establecer relaciones filogenéticas; y así obtener información que es de gran utilidad en el mejoramiento de los cultivos. Por ello, se considera importante caracterizar las accesiones cultivadas y silvestres de *P. vulgaris* y de sus parientes del género *Phaseolus* que se conservan en el Banco de Germoplasma de Zamorano, con el fin de promover su utilización como cultivares o como progenitores en programas de mejoramiento. La ampliación de la base genética mediante el mejoramiento convencional y la selección asistida con marcadores, es una alternativa para incrementar la estabilidad de las variedades en ambientes diversos como los que se presentan en Centroamérica.

El objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad genética del frijol común y sus parientes del género *Phaseolus*, de la colección hondureña que se conserva en el Banco de Germoplasma de Zamorano, con el fin de planificar su conservación a largo plazo y su uso potencial en actividades de mejoramiento y selección.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las accesiones de germoplasma utilizadas en este estudio fueron sembradas y analizadas durante el periodo 2008-09, en las instalaciones del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) y el Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

### Material genético

Se utilizaron 69 accesiones del género *Phaseolus* del Banco de Germoplasma, recolectadas durante los periodos 1990-94 y 2001-03 en territorio hondureño, incluyendo variedades mejoradas desarrolladas en Honduras y de otras regiones. Las accesiones del Banco de Germoplasma fueron elegidas con base en las zonas agroecológicas de procedencia, características agronómicas y comerciales. El germoplasma utilizado en el estudio incluye un total de 64 accesiones de *P. vulgaris*, constituido por 44 variedades criollas y cinco accesiones silvestres de frijol común del germoplasma hondureño, nueve variedades mejoradas de Honduras, cuatro accesiones andinas, dos accesiones de la raza

**Cuadro 1.** Accesiones del género *Phaseolus* del Banco de Germoplasma de Honduras utilizadas en el estudio. Zamorano, Honduras, 2008.

	<b>Código</b>	<b>Nombre local</b>	<b>Departamento</b>	<b>Latitud Norte</b>	<b>Longitud Oeste</b>	<b>Altitud (msnm)</b>
1)	F0009	Concha Blanca	Yoro	15° 04' 40"	87° 22' 15"	1700
2)	F0022	Cuarenteño	Olancho	14° 33' 15"	86° 17' 20"	400
3)	F0026	Marcialeño	Olancho	14° 44' 35"	86° 05' 30"	400
4)	F0030	Chilito	Olancho	14° 55' 20"	86° 21' 30"	575
5)	F0034	Gualiqueme	Yoro	15° 06' 15"	87° 10' 30"	650
6)	F0047	Frijol de Montaña	Yoro	15° 01' 55"	87° 16' 45"	1400
7)	F0057	Vaina Rosada	Yoro	15° 12' 20"	87° 22' 00"	1150
8)	F0072	Desarrural	Fco. Morazán	13° 41' 50"	87° 08' 40"	800
9)	F0077	Frijol Arbolito	Fco. Morazán	13° 47' 35"	87° 28' 10"	200
10)	F0079	Frijol Rojo	Valle	13° 39' 40"	87° 32' 00"	150
11)	F0080	Retinto Rojo	Valle	13° 39' 40"	87° 32' 00"	150
12)	F0085	Chelito	Valle	13° 42' 35"	87° 33' 20"	450
13)	F0091	Cuarenteño	Choluteca	13° 18' 05"	86° 59' 20"	650
14)	F0097	Arbolito	Choluteca	13° 15' 40"	86° 59' 20"	400
15)	F0102	Sangre de Toro	Sta. Bárbara	15° 03' 30"	88° 25' 00"	1200
16)	F0104	Retinto Vaina Blanca	Sta. Bárbara	14° 42' 35"	88° 05' 20"	400
17)	F0107	Frijol Ñato	Comayagua	14° 54' 30"	87° 19' 30"	780
18)	F0117	Danlí	Comayagua	14° 54' 45"	87° 22' 40"	350
19)	F0126	Negro Ligero	Intibucá	14° 18' 15"	88° 23' 10"	850
20)	F0130	Talete	Intibucá	14° 00' 00"	88° 22' 40"	968
21)	F0147	Chile	Copán	15° 02' 10"	88° 45' 55"	490
22)	F0134	Milpero	Intibucá	14° 16' 55"	88° 14' 35"	1773
23)	F0155	Arbolito Vaina Roja	Copán	15° 08' 40"	88° 40' 30"	350
24)	F0162	Liberalito	Sta. Bárbara	15° 01' 35"	88° 38' 40"	850
25)	F0169	Cincuentaño	Copán	14° 01' 00"	88° 52' 00"	1200
26)	F0190	Talete de Guía	Lempira	14° 49' 50"	88° 36' 30"	900
27)	F0201	Talete	Lempira	14° 26' 50"	88° 39' 25"	1750
28)	F0211	Alilí	Lempira	14° 06' 00"	88° 34' 05"	800
29)	F0218	Arbolito Rojo	Lempira	14° 02' 00"	88° 37' 00"	275
30)	F0245	Gringo	Ocotepeque	14° 30' 15"	88° 48' 55"	1830
31)	F0253	Negro	Ocotepeque	14° 28' 45"	89° 12' 35"	887
32)	F0264	Arbolito	Ocotepeque	14° 18' 20"	89° 01' 10"	1200
33)	F0321	Vaina Blanca	Sta. Bárbara	15° 28' 00"	88° 31' 00"	565
34)	F0326	Pronto a la Olla	El Paraíso	14° 06' 01"	86° 05' 36"	950
35)	F0332	Seda	El Paraíso	13° 53' 50"	85° 53' 50"	550
36)	F0340	Chile	El Paraíso	13° 49' 02"	86° 24' 14"	1100
37)	F0386	Vaina Blanca	Choluteca	15° 15' 40"	86° 56' 54"	560
38)	F0371	Moro	Choluteca	13° 30' 00"	87° 11' 30"	910
39)	F0405	Arbolito Vaina Blanca	Atlántida	15° 39' 43"	86° 40' 25"	320
40)	F0419	Chile	Atlántida	15° 39' 35"	87° 25' 50"	250
41)	F0421	Vaina Roja Arbolito	Atlántida	15° 38' 39"	87° 21' 47"	100
42)	F0428	Rojo	Olancho	15° 19' 00"	86° 33' 55"	400
43)	F0505	Liberal	Fco. Morazán	14° 48' 40"	86° 56' 00"	835

Continúa...

continuación Cuadro 1...

	Código	Nombre local	Departamento	Latitud Norte	Longitud Oeste	Altitud (msnm)
44)	F0518	Frijol Mantequilla	Fco. Morazán	14°42' 00"	87°06' 45"	700
45)	F0559	<i>P. vulgaris silvestre</i>	Fco. Morazán	14°01' 98"	87°06' 59"	1225
46)	F0565	<i>P. vulgaris silvestre</i>	Fco. Morazán	14°02' 71"	87°01' 46"	1250
47)	F0665	<i>P. vulgaris silvestre</i>	Fco. Morazán	14°05' 01"	87°20' 56"	1340
48)	F0580	<i>P. vulgaris silvestre</i>	El Paraíso	13°51' 17"	86°55' 71"	1600
49)	F0574	<i>P. vulgaris silvestre</i>	Fco. Morazán	14°13' 68"	87°04' 55"	1160
50)	Amadeus 77	Variedad mejorada liberada en el 2003				
51)	Tío Canela 75	Variedad mejorada liberada en 1996				
52)	Dorado	Variedad mejorada liberada en el 2000				
53)	Milenio	Variedad mejorada adoptada por agricultores (no liberada oficialmente)				
54)	Cardenal	Variedad liberada en el 2007				
55)	DEORHO	Variedad liberada en el 2007				
56)	Palmichal 1	Variedad liberada en el 2004				
57)	Macuzalito	Variedad liberada en el 2004				
58)	Nva Esperanza 01	Variedad liberada en el 2004				
59)	G06727	Accesión andina del germoplasma del CIAT				
60)	G05686	Accesión andina del germoplasma del CIAT				
61)	Pompadour J	Variedad criolla (andina) de la República Dominicana				
62)	AFR 180	Accesión andina del germoplasma del CIAT				
63)	Great N 31	Accesión de la raza Jalisco, reservorio Mesoamericano				
64)	MAM 38	Accesión de la raza Jalisco, reservorio Mesoamericano				
65)	F0569	<i>P. coccineus</i>	El Paraíso	13°57' 318"	87°53' 77"	1400
66)	F0571	<i>P. coccineus</i>	El Paraíso	13°56' 698"	86°54' 29"	1475
67)	F0583	<i>P. coccineus</i>	El Paraíso	13°51' 057"	86°55' 62"	1600
68)	F0630	<i>P. coccineus</i>	Fco. Morazán	16°13' 203"	89°04' 83"	1550
69)	F0661	<i>P. coccineus</i>	Fco. Morazán	14°04' 062"	87°24' 82"	1560

Accesiones criollas cultivadas (1- 44), silvestres (45-49), variedades mejoradas (50-58), accesiones andinas (59-62) y accesiones mesoamericanas de la raza Jalisco (63-64) de *P. vulgaris*, y accesiones cultivadas (frijol "chinapopo") de *P. coccineus* (65-69).

Jalisco del reservorio mesoamericano, y cinco accesiones de *P. coccineus* colectadas en Honduras (Cuadro 1). Las 44 accesiones criollas del germoplasma hondureño de frijol común se seleccionaron con base en su procedencia, usando como criterios la altitud de las localidades y que sean provenientes de los departamentos representados en la colección. Las accesiones silvestres y las de *P. coccineus*, ambas de Honduras, las dos accesiones andinas y las dos de la raza Jalisco, y las variedades mejoradas, se

usaron para medir las distancias o diferencias genéticas de las criollas con respecto a éstas.

### Siembra

Las accesiones del estudio fueron sembradas en el Invernadero #2, en maceteros individuales conteniendo 4,0 kg de una mezcla de suelo y compost preparado con residuos de plantas y suelo reciclado

de invernaderos, en una relación en volumen de 1:1. Las semillas fueron pre-germinadas para garantizar un establecimiento uniforme de las accesiones.

### Extracción de ADN

Las muestras de tejido fueron colectadas a los 20 días después de la siembra y la extracción de ADN genómico se realizó utilizando el protocolo de Skroch *et al.* (1998). Se colocaron de cinco a seis primordios de la tercera y cuarta hoja trifoliada en microtubos eppendorf de 1,5 ml, a los cuales se agregó 50  $\mu$ l de buffer de extracción PEX (etil xantogenato de potasio), y se maceró con pistilos de plástico. A cada muestra macerada se le agregó 450  $\mu$ l de buffer PEX, seguido de un vortex antes de ser sometidas a 65 °C por una hora en baño maría; luego las muestras fueron centrifugadas a 14 000 revoluciones por minuto (rpm) por 10 minutos para separar el tejido del buffer. El sobrenadante fue transferido a un microtubo limpio de 1,5 ml agregándose 1,0 ml de una solución 6:1 etanol: acetato de amonio 7,5 M, para precipitar los ácidos nucleicos. Se dejó reposar durante 15 minutos y luego fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos para el peletizado de los ácidos nucleicos. El ARN

se desnaturalizó mediante una solución de 300  $\mu$ l de ARNasa (100 ng/ml) por 60 minutos. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm x cinco minutos para coleccionar los restos de la ARNasa y del ARN degradado. El sobrenadante fue transferido a un microtubo limpio y después se precipitó el ADN con una solución 3M de etanol: acetato de sodio 10:1 por 15 minutos y se peletizó centrifugando a 3000 rpm por cinco minutos. Una vez peletizada la muestra, se procedió a clarificar el ADN dos veces, usando una solución de etanol al 70%, centrifugando a 14 000 rpm durante 15 segundos, para luego dejar secar las muestras por 13 h. Los pellets secos fueron rehidratados con 100  $\mu$ l de buffer TE 0,1X en baño maría a 65 °C por 15 minutos.

### Cuantificación y dilución de ADN

Para cuantificar las muestras de ADN se usó un fluorómetro Hoefer DyNA Quant™ 200. El primer paso fue calibrar el fluorómetro usando ADN estándar extraído de timo de bovino a 100 ng/ml. El buffer usado en la cuantificación fue TNE (100 ml TNE 1X y 10  $\mu$ l de solución de tinte Dye). Una vez obtenido el dato de cuantificación, se procedió a diluir las muestras

**Cuadro 2.** Cebadores (primers) usados para identificar los marcadores RAPD en 69 accesiones de genoplasmata del género *Phaseolus* de Honduras. Zamorano, Honduras, 2008-09.

No.	Cebador	Secuencia	No.	Cebador	Secuencia
1	OPA-02	5'- TGCCGAGCTG- 3'	16	OPO-13	GTCAGAGTCC
2	OPB-10	5'- CTGCTGGGAC- 3'	17	OPO-19	GGTGCACGTT
3	OPB-15	GGAGGGTGTT	18	OPP-09	GTGGTCCGCA
4	OPC-04	CCGCATCTAC	19	OPQ-09	GGCTAACCGA
5	OPC-11	AAAGCTGCGG	20	OPQ-14	GGACGCTTCA
6	OPD-08	GTGTGCCCCA	21	OPR-02	CACAGCTGCC
7	OPF-13	GGCTGCAGAA	22	OPT-07	CCTCTCGACA
8	OPG-03	GAGCCCTCCA	23	OPT-15	GGATGCCACT
9	OPG-05	CTGAGACGGA	24	OPU-01	ACGGACGTCA
10	OPG-06	GTGCCTAACC	25	OPY-06	AAGGCTCACC
11	OPG-08	TCACGTCCAC	26	OPU-19	GTCAGTGCGG
12	OPH-04	GGAAGTCGCC	27	OPV-10	GGACCTGCTG
13	OPH-20	GGGAGACATC	28	OPW-13	CACAGCGACA
14	OPI-16	TCTCCGCCCT	29	OPH-08	GAAACACCCC
15	OPO-05	CCCAGTCACT	30	OPAC-15	TGCCGTGAGA

Cebadores de Operon Technologies Inc., EE.UU.

en 100  $\mu$ l de buffer TE, hasta obtener una solución de ADN a una concentración de 10 ng/ml usando la fórmula  $V_i=1000/(C_i-10)$ , donde  $V_i$ =volumen inicial y  $C_i$ = concentración inicial.

### PCR con los cebadores RAPD

Las muestras de ADN de cada genotipo fueron amplificadas usando 30 cebadores (primers) RAPD de Operon Technologies, Inc. (Cuadro 2). Las reacciones de amplificación fueron hechas bajo las siguientes condiciones: 3,4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, 1,5  $\mu$ l buffer green 5X de PCR con MgCl<sub>2</sub> (2 mM), 1,5  $\mu$ l de dNTP (4 mM), 0,6  $\mu$ l del primer (10  $\mu$ g/ml), 0,5  $\mu$ l de Taq Polimerasa GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Promega (5 u/ $\mu$ l) y 7,5  $\mu$ l de ADN (10 ng/ml), para un total de 15  $\mu$ l por reacción. La PCR fue realizada en un termociclador TECHNE TC-512, bajo el siguiente perfil térmico: 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.

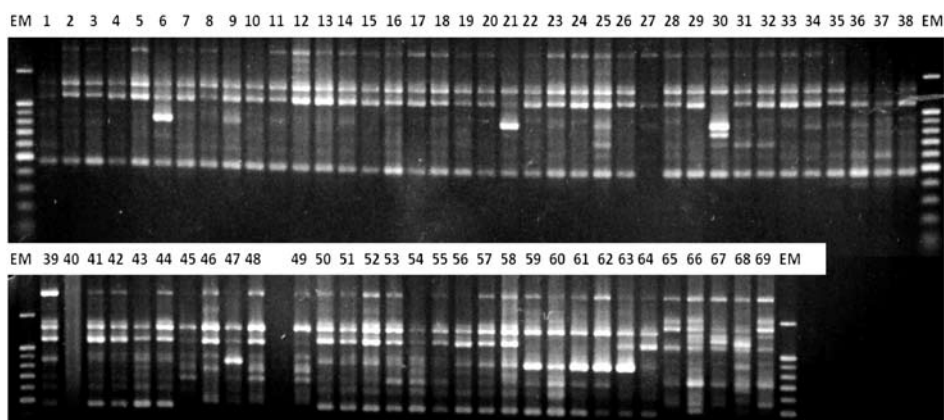
### Electroforesis

Se utilizaron 15  $\mu$ l de producto de PCR en bandejas con 40 espacios por fila y 10  $\mu$ l de escalera molecular

de 100 pb (100bp DNA ladder ® Promega) diluida al 30% en buffer TE al 0,1X, la cual fue colocada al inicio y al final de las filas para de esa manera poder establecer el tamaño de los polimorfismos amplificados en PCR.

Para la separación de los fragmentos amplificados en PCR se usó un gel de agarosa al 1,2% con buffer TBE 0.5X, en bandejas horizontales Maxicell EC 360M, con un generador de corriente PS 250/2,5 AMP, a 95 V por 90 minutos. Después de la corrida electroforética los geles fueron teñidos durante 10 minutos en una solución de bromuro de etidio (100 mg/ml), y luego lavados en 500 ml de agua destilada, para eliminar el exceso de bromuro, durante 10 minutos. Para capturar las imágenes se usó el sistema EDAS 290 de Kodak, lográndose imágenes claras para la elaboración de las matrices. Las bandas tomadas en cuenta para la generación de las matrices fueron las de mediana a alta intensidad y claridad; las bandas ubicadas en medio de las unidades de medida de la escalera se tomaron como 0,5 del valor de las bandas entre las que se encontraban.

Se utilizaron 30 cebadores previamente empleados en otras caracterizaciones de germoplasma de frijol común mediante la técnica RAPD (Skroch *et al.* 1998, Beebe *et al.* 2000). La mayoría de marcadores RAPD generaron un buen número de polimorfismos (Figura 1), los cuales permitieron los análisis para determinar las relaciones genéticas entre los genotipos



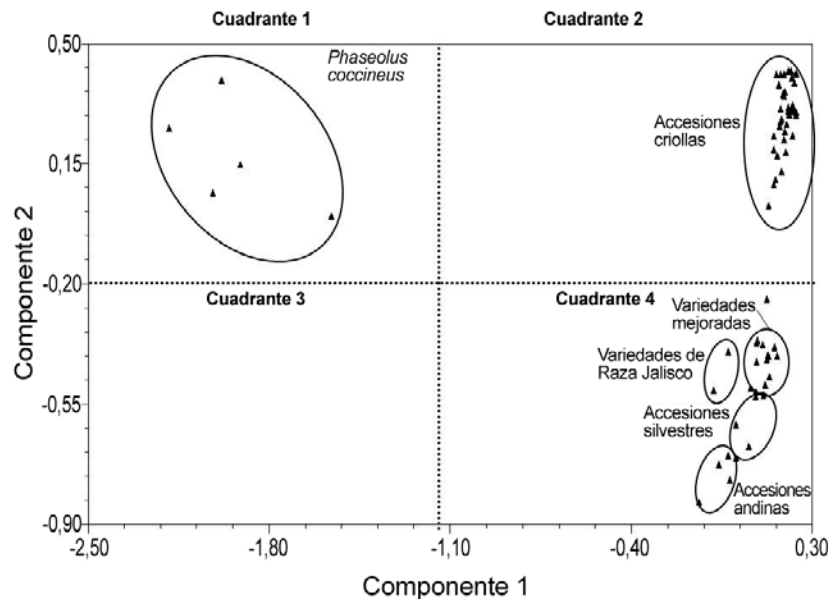
**Figura 1.** Gel de la electroforesis del marcador RAPD OPO-05 mostrando la escalera molecular (EM) y los polimorfismos de ADN generados en las 69 accesiones del género *Phaseolus*. Zamorano, Honduras, 2009.

estudiados. Para la caracterización molecular se usó una matriz tipo 1 con 69 columnas por 341 filas, considerando los valores 1 para la presencia del alelo y 0 para la ausencia del alelo. Para establecer las distancias genéticas de las accesiones se calculó el coeficiente o índice de similitud de Dice (1945), utilizado para correlaciones de eventos discretos. La matriz de distancias genéticas se analizó por el método UPGMA (siglas en inglés de Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Se elaboró un dendrograma con los datos analizados utilizando el paquete NTSYSpc 2.1.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis molecular de las accesiones de *Phaseolus* mediante la técnica RAPD usando 30 cebadores, permitió generar 341 fragmentos polimórficos de ADN cuya información fue utilizada en los análisis de

agrupamiento por el método UPGMA. Según el análisis de correspondencia, considerando los dos primeros componentes, las accesiones se distribuyen en varios grupos de acuerdo al grado de similitud (o distancia) genética, incluyendo al grupo de las accesiones de *P. coccineus* en el cuadrante 1 superior izquierdo, muy distante de las accesiones de frijol común (*P. vulgaris*), ubicados en los cuadrantes 2 y 4 (Figura 2). La mayoría de las variedades criollas de Honduras se agruparon en el cuadrante 2, parte superior derecha de la gráfica. Por otro lado, en el cuadrante 4, inferior derecho, se observan relativamente diferenciados los grupos de las accesiones andinas y silvestres. Las variedades mejoradas se ubican hacia la parte superior de este cuarto cuadrante; mientras que, las dos variedades mesoamericanas de la raza Jalisco se separan ligeramente de las mejoradas hacia la izquierda de este cuadrante 4. Estos resultados sugieren las marcadas diferencias genéticas entre las especies *P. vulgaris* y *P. coccineus*, seguidas de las diferencias genéticas



**Figura 2.** Dispersión de las 69 accesiones del germoplasma del género *Phaseolus* de Honduras con base en datos de polimorfismos de ADN generados con 30 marcadores RAPD según el Análisis de Correspondencia. Accesiones de *P. coccineus* en el cuadrante 1 y de *P. vulgaris* en cuadrantes 2 y 4. Zamorano, Honduras, 2009.

entre las accesiones andinas y mesoamericanas de *P. vulgaris*, como se ha determinado en previos estudios (Skroch *et al.* 1992, Singh *et al.* 1991).

En general, los grupos están claramente definidos, de acuerdo con su mayor o menor similaridad en su composición genética (Figura 2). Las variedades mejoradas liberadas en los últimos 15 años en Honduras, se encuentran más cerca de las accesiones andinas y de la raza Jalisco, así como de las silvestres, y todas estas ubicadas en el cuadrante 4; mientras que, la mayoría de las accesiones criollas (38 de un total de 44, es decir el 86,4%) se ubican como un grupo separado en el cuadrante 2. De las seis accesiones criollas restantes (13,6%), cinco se agrupan con las variedades mejoradas en el cuadrante 4, exceptuando a la variedad Arbolito Vaina Blanca. Esta distancia sugiere la importancia en la contribución potencial de estas accesiones criollas al mejoramiento del frijol común en Honduras; ya que los resultados indican marcadas diferencias genéticas con las variedades mejoradas actualmente disponibles, lo cual aparentemente se ha debido al limitado uso de la diversidad genética de las accesiones criollas de Honduras en el mejoramiento por cruzamiento y selección de este importante cultivo.

En el dendograma generado mediante el análisis de agrupamiento del método UPGMA se observan grupos de accesiones bien diferenciados (Figura 3). El primer grupo incluye las cinco accesiones de *P. coccineus* (F0569, F0571, F0583, F0630 y F0661), que se separan de las accesiones de *P. vulgaris* a partir de coeficiente de Dice (CD) o índice de similaridad de 0,48, lo cual indica una distancia genética significativa de las accesiones de esta especie con las demás accesiones cultivadas y silvestres de frijol común (*P. vulgaris*). Sin embargo, la similaridad genética existente entre estas dos especies explica su relación cercana dentro del reservorio genético del género *Phaseolus*, lo cual explica la factibilidad de la utilización de accesiones de *P. coccineus* en programas de mejoramiento de *P. vulgaris* (Beaver *et al.* 2003). Las accesiones de *P. vulgaris* presentan varios grupos factibles de identificar por su procedencia u origen. En primera instancia las cuatro accesiones andinas (A) de *P. vulgaris* forman parte de un grupo separado de las accesiones Mesoamericanas (M) a partir de índice de Dice de 0,64. A su vez, el grupo de las andinas se separa en dos subgrupos relacionados (índice de Dice de 0,78), el primero conformado

por AFR 180 y Pompadour J (línea mejorada tipo rojo arriñonada y variedad criolla rojo moteado de la República Dominicana, respectivamente), y el segundo por G05686 y G06727 (ambas accesiones andinas de la raza Nueva Granada son resistentes a la mancha angular).

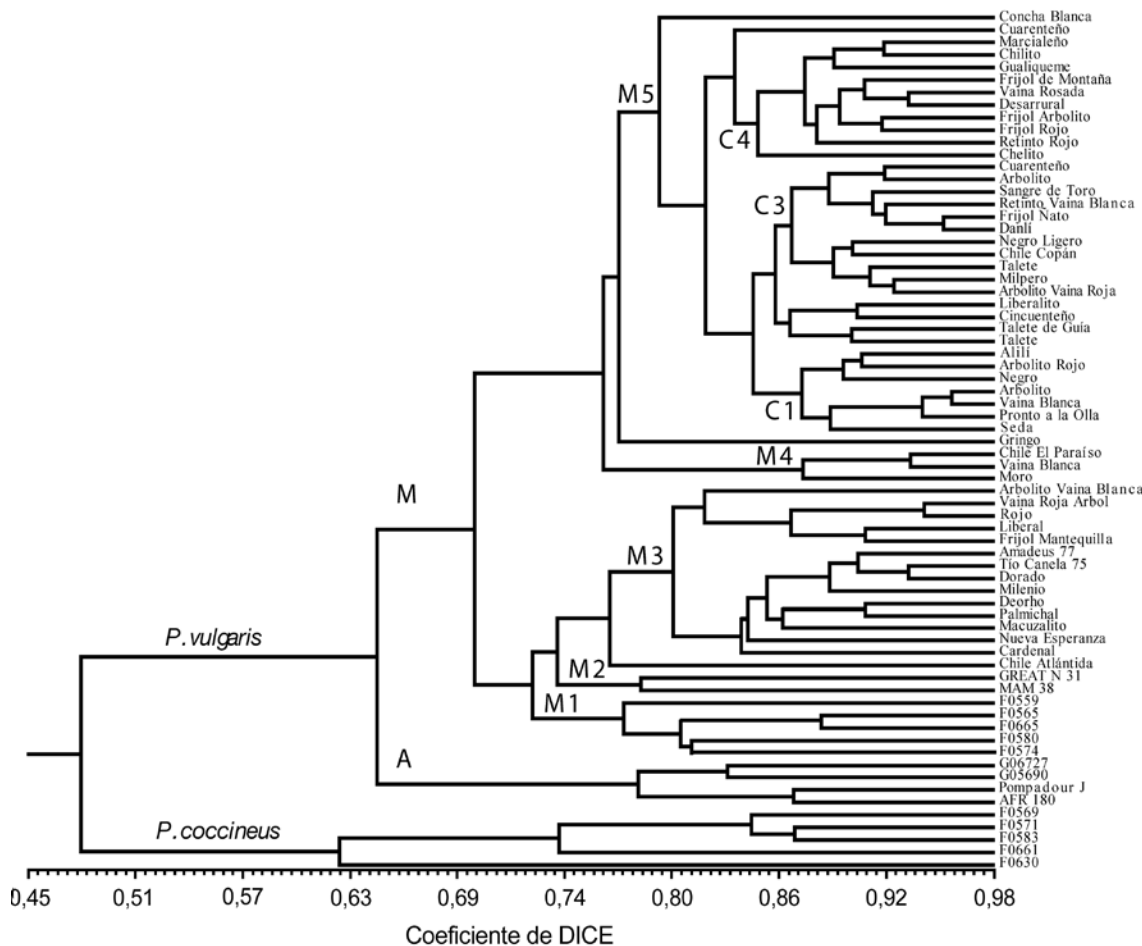
En las accesiones mesoamericanas se distinguen las agrupaciones siguientes. En las cinco accesiones silvestres de *P. vulgaris* provenientes del germoplasma de Honduras (M1), se presenta dos bifurcaciones a un CDice de 0,77, es decir con un buen grado de similitud genética pero incluyendo un nivel de diferenciación entre ellas. El siguiente grupo (M2) incluye las accesiones de la raza Jalisco Great Northern 31 y MAM 38, las cuales muestran una similitud genética (CD) de 0,79 entre ellas.

El grupo de las variedades mejoradas de Honduras (M3), está conformando por variedades liberadas en los últimos 20 años, en las que los resultados sugieren una similitud genética entre ellas que las diferencia de las variedades criollas. Este grupo se separa de la variedad criolla Chile de la región de Atlántida (F0419) a un CD de 0,77; y del grupo que incluye a cinco variedades criollas (M4), conformado por Frijol Mantequilla (F0518), Liberal (F0505), Rojo (F0428), Arbolito Vaina Roja (F0155) y Arbolito Vaina Blanca (F0405), procedentes de los departamentos de Atlántida, Olancho y Francisco Morazán de Honduras, a un CD de 0,81.

El grupo que contiene la mayoría de las accesiones criollas de frijol común (M5), incluye variedades criollas de varios departamentos de Honduras, por lo cual requiere una mayor explicación. Este grupo M5 se separa en dos subgrupos; en el primero, se observa la separación de la accesión Gringo (F0245) de Ocotepeque, un frijol de altura tipo habichuela, del resto de las accesiones (Figura 3).

En el grupo que incluye el resto de accesiones criollas, se encuentran un pequeño subgrupo de siete accesiones criollas identificado como C1, compuesto por Seda (F0332), Pronto a la Olla (F0326), Vaina Blanca (F0321), Arbolito (F0264), Negro (F0253), Arbolito Rojo (F0218) y Alilí (F0211). Las accesiones Talete de Lempira (F0201), Talete de Guía (F0190), Cincuentaño (FF0169) y Liberalito (F0162), constituyen el segundo subgrupo de criollas (C2). El tercer subgrupo (C3) está conformado por las accesiones criollas Arbolito Vaina Roja (F0155),





**Figura 3.** Dendrograma de las similitudes genéticas de 69 accesiones de germoplasma del género *Phaseolus* de Honduras según el coeficiente de Dice. El grupo de *P. vulgaris* se divide en accesiones de los reservorios Andino (A) y Mesoamericano (M); y el reservorio Mesoamericano incluye accesiones silvestres (M1), variedades de la raza Jalisco (M2), variedades mejoradas (M3) y criollas (M4 y M5) de Honduras. Zamorano, Honduras, 2009.

Milpero (F0134), Talete de Intibucá (F0130), Chile de Copán (FF0147), Negro Liger (F00126), Danlí (F0117), Frijol Ñato (F0107), Retinto Vaina Blanca (F0104), Sangre de Toro (F0102), Arbolito ((F0097) y Cuarenteño (F0091).

El cuarto subgrupo (C4) lo constituyen las accesiones criollas Chelito (F0085), Retinto Rojo (F0080), Frijol Rojo (F0079), Frijol Arbolito (F0077), Desarrural (F0072), Vaina Rosada (F0057), Frijol de Montaña (F0047), Gualiqueme (F0034), Chilito (F0030), Marcialeño (F0026) y Cuarenteño de Olancho

(F0022). Por otro lado, La accesión criolla Concha Blanca (F0007) de Yoro, se separa de las accesiones criollas mencionadas anteriormente a un CD de 0,80. Al observar las divisiones de estas accesiones criollas, que en su mayoría se presenta a un CD de 0,85, se puede decir que representan agrupaciones de la gran diversidad genética existente de acuerdo a su distribución en las diferentes regiones de Honduras.

En la Figura 3, se observan dos situaciones contrastantes en cuanto a la similitud genética y sus lugares de recolección. El primero es el caso de

las accesiones Frijol Ñato (F0107) y Danlí (F0117) en el subgrupo C3, colectados en comunidades de Comayagua muy cercanas, y que son muy similares (CD de 0,95). Pero por otro lado, las accesiones Arbolito (F0264) y Vaina Blanca (F0321) en el subgrupo C1, también presentan alta similitud genética (CD de 0,96), pero provienen de diferentes departamentos, Ocotepeque y Santa Bárbara, respectivamente. La alta similitud genética en ambos casos, sugiere de que se puede tratar del mismo genotipo o que estos provienen de un ancestro en común. En el segundo caso, se observa efectos de la dispersión y adaptación de estas accesiones a diferentes condiciones.

El germoplasma hondureño evaluado muestra un gran potencial para el mejoramiento genético de frijol común. Algunas de las accesiones criollas estudiadas han sido incluidas en los últimos años en programas de mejoramiento y ampliación de la base genética del frijol común para Centro América. Las accesiones de frijol silvestre y las de *P. coccineus* representan una fuente de diversidad adicional, siendo las primeras de mayor potencial por su mayor compatibilidad con las formas cultivadas de *P. vulgaris*.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio de caracterización de germoplasma de frijol utilizando la técnica RAPD, y los de estudios anteriores con esta técnica (Skroch *et al.* 1998, Beebe *et al.* 2000, Miranda *et al.* 2006), se recomienda continuar con la caracterización de accesiones de la colección de Honduras, incluyendo un mayor número de accesiones silvestres y de *P. coccineus*. Adicionalmente, se sugiere ampliar este trabajo incluyendo accesiones de El Salvador y Nicaragua, para determinar si la diversidad genética utilizada por los agricultores en estos países está muy relacionada o es especialmente diversa con relación a la procedente de Honduras; con el fin de promover la recolección, conservación y utilización de la diversidad genética de *P. vulgaris* y sus parientes existentes en el ámbito regional.

## LITERATURA CITADA

- Beaver, JS; Rosas, JC; Myers, J; Acosta, J; Kelly, JD; Nchimbi-msolla, S; Misangu, R; Bokosi, J; Temple, S; Arnaud-Santana, E; Coyne, DP. 2003. Contributions of the Bean/Cowpea CRSP to cultivar and germplasm development in common bean. *Field Crops Research* 82:87-102.
- Beebe, S; Ochoa, I; Skroch, PW; Nienhuis, J; Tivang, J. 1995. Genetic diversity among common bean breeding lines developed for Central America. *Crop Science* 35(4):1178-1183.
- Beebe, S; Pedraza, F. 1998. Perspectivas para el uso de marcadores moleculares en el mejoramiento del frijol. *In: R. Lépiz (Comp.). Taller Internacional de Mejoramiento Genético de Frijol Negro Mesoamericano. PROFRIJOL, Veracruz, México.* p. 132-139.
- Beebe, S; Skroch, PW; Thome, J; Duque, MC; Pedraza, F; Nienhuis, J. 2000. Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondance analysis of RAPD. *Crop Science* 40(1):264-273.
- Caixeta, M; Alves. 2001. Caracterizacao da diversidad e genética em feijao por meio de marcadores RAPD. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira, Brasilia* 36(2):381-385.
- Dice, LR. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26:297-302.
- Duran, LA; Blair, MW; Giraldo, Z; Machiavelli, RE; Prophete, E; Nin, JC; Beaver, JS. 2005. Morphological and molecular characterization of common bean landraces and cultivars from the Caribbean. *Crop Science* 45(4):1320-1328.
- Emygdio, B; Antunes, IF; Choer, E; Nedel, JL. 2003. Eficiencia de coeficientes de similaridade em genotipos de feijao mediante marcadores RAPD. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira, Brasilia* 38(2):243-250.
- Guimaraes, E; Ruane, J; Scherf, B; Sonnino, A; Dargie, J. 2007. Marker-assisted selection, current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. *Food and Agricultural Organization of the United Nations, FAO, Roma, Italia.* 471 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.
- Miranda, S; Rosas, JC; Aranda, LL; Ortíz, R; Ponce, M; Ríos, H. 2006. Análisis molecular de la diversidad genética de frijol común manejada por campesinos de Cuba. *Agronomía Mesoamericana* 17(3):369-382.
- Rosas, JC; Gallardo, O; Jiménez, J. 2003. Mejoramiento del frijol común mediante enfoques participativos en Honduras. *Agronomía Mesoamericana* 14(1):1-9.
- Singh, S; Gepts, P; Debouk, D. 1991. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany* 45:379-396.

- Skroch, P; Tivang, J; Nienhuis, J. 1992. Analysis of genetics relationships using RAPD marker data. Joint Plant Breeding Symposium Series. Minneapolis, Minnesota, USA. p. 26-30.
- Skroch, P; Nienhuis, J; Beebe, S; Tohme, J; Pedraza, F. 1998. Comparison of Mexican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) core and reserve germplasm collection. Crop Science 38(2):488-496.
- Vera, CM; Paredes, MC; Becerra, VV. 1999. Estudio comparativo de diversidad morfológica, isoenzimática y RAPDs dentro y entre clases comerciales de fréjol chileno (*Phaseolus vulgaris* L.). Agricultura Técnica 59(4):247-259.

