

# CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA MEDIANTE EL USO DE MARCADORES RAPDs, DE UN GRUPO DE GENOTIPOS NATIVOS Y COMERCIALES DE CARAOTA EN VENEZUELA

## CHARACTERIZATION OF GENETIC VARIABILITY USING RAPDs MARKERS, IN A GROUP OF NATIVE AND COMMERCIAL GENOTYPES OF BEAN IN VENEZUELA

Margaret Gutiérrez Mulas\* y Carmen Amalia Rincón A.\*

\*Investigadoras. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Maracay, estado Aragua. Venezuela.  
Correo electrónico: mgutierrez@inia.gob.ve

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la variabilidad genética de la caraota, *Phaseolus vulgaris* L., en un grupo de genotipos nativos, colectados en sistemas de producción de pequeños agricultores y variedades comerciales del Banco de Germoplasma de leguminosas de grano del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP), Venezuela; para ello, se utilizaron marcadores moleculares RAPDs, de los cuales resultaron útiles los primers o iniciadores de la serie M y Y (OPM16 y OPY17), por su eficiencia en la separación entre genotipos cultivados y nativos. Los primers OPM-16, OPY-07, OPY-03, OPY-04, OPM-20, OPA-07 y OPY-17 produjeron 47 fragmentos de amplificación reproducibles, permitiendo la clasificación de nativos y comerciales en seis grupos, y separando al testigo comercial y una línea mejorada de los demás genotipos evaluados. Los grupos resultan útiles a los fines de proponer un programa de mejora genética, incluyendo la ampliación de la base genética, para cultivares. Los de color negro, pudieron mejorarse a partir de cruzamientos de Tacarigua (grupo I) con los genotipos de 19 y 13 (grupo IV), distantes en 0,75 unidades ultramétricas (UUM). También se puede cruzar la línea mejorada 13 (grupo VI) con los genotipos 6 y 12 (grupo III) a 0,75 UUM. Además, es recomendable ensayar cruces con el genotipo 12, por haber presentado también un bajo índice de susceptibilidad a la sequía. Los genotipos de otros colores se pueden mejorar con el cruce del genotipo 10, rosado (grupo II) con el genotipo 2 de color blanco (grupo V), a 0,60 UUM.

**Palabras Clave:** *Phaseolus vulgaris* L.; genotipos nativos; RAPDs; variabilidad genética.

### SUMMARY

To characterize the genetic variability of a group of native genotypes, collected from small farmers production systems and commercial varieties of the germplasm bank accessions at Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP), Venezuela, RAPDs molecular markers were used. Primers of the series M and Y, (OPM16 and OPY17), were useful for their efficiency in the separation between cultivated and native genotypes. Primers OPM-16, OPY-07, OPY-03, OPY-04, OPM-20, OPA-07 and OPY-17 produced 47 reproducible amplification fragments classifying native and commercial genotypes into six groups, and separating the commercial control and one enhanced line from the other germplasm evaluated. Those groups are useful for the development of a breeding program, including broadening the genetic base of Venezuelan cultivars, to improve black beans cultivars, through crosses of Tacarigua, group I, with the black genotypes 19 and 13, which, in another experiment with water deficit assessment, reached arithmetic and geometric average yields far superior to both commercial controls and were classified in Group VI, located at 0.75 ultrametric units (UUM). Also, through crosses of the improved line 13, group VI, with black seed genotypes 6 and 12, both with high yields and classified in Group III, at 0.75 UUM. It is also advisable to make the crossing with genotype 12, characterized by a low drought susceptibility index. For breeding genotypes of non black seeds, it is advisable the crossing of pink seed genotype 10, group II, with the white seed genotype 2 classified in group V, at 0.60 UUM.

**Key Words:** *Phaseolus vulgaris* L.; landraces; RAPDs; genetic variability.

RECIBIDO: octubre 22, 2010

## INTRODUCCIÓN

La caraota, *Phaseolus vulgaris* L., es un cultivo morfológicamente muy diverso; con importantes variaciones de hábito de crecimiento, colores de semilla y de vaina, así como en su fenología. Esta diversidad refleja el amplio rango de ambientes ecológicos y humanos en el cual se ha desarrollado.

Los materiales locales, conservados en el Banco de Germoplasma del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) en Venezuela, provienen de localidades muy diversas en cuanto a condiciones agroecológicas, observándose importantes variaciones morfológicas y fenológicas, de alta heredabilidad, que permiten una rápida discriminación fenotípica del germoplasma. Estos descriptores de las características morfológicas, así como los experimentos sobre el comportamiento agronómico, han sido la principal herramienta, utilizada hasta el presente, en la caracterización y evaluación de estos recursos genéticos.

Sin embargo, las técnicas moleculares, debido a su eficiencia y rapidez, han incrementado enormemente las posibilidades de descripción y por ende de utilización del germoplasma.

La mayor atracción de dichas técnicas es la posibilidad de obtener información acerca de la variabilidad del ADN, a partir de pequeñas cantidades de tejido vegetal, en cualquier estado de desarrollo. Se considera que las mismas son viables para detectar la diversidad genética con mayor precisión que las caracterizaciones tradicionales (Berthaud, 1997) y que los marcadores moleculares son menos influenciados por el ambiente (Lowe *et al.*, 1996).

Según Williams *et al.* (1990), en el caso del RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) se amplifican pequeñas secuencias aleatorias en el ADN usando iniciadores arbitrarios, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés, PCR). Este método es simple y efectivo al revelar polimorfismo, también es relativamente económico, universalmente aplicable y ha sido extensivamente aplicado para la caracterización de la diversidad genética, la estimación de las similitudes y distancias genéticas, la identificación y clasificación y para los estudios de población (Ferreira *et al.*, 2003).

Es bien conocido que la base de cualquier programa de mejoramiento es la existencia de la variabilidad genética deseable, sin la cual no se podría lograr progreso

alguno. La caraota es una especie autógama ( $2n=22$ ) por lo que todos los cultivares comerciales son líneas puras o mezclas de líneas. La mayor diversidad genética en cuanto a los tipos de semilla pequeña se encuentra en las accesiones de América Central, México, Venezuela y Brasil; por su parte, la mayor variabilidad genética en los tipos de semilla mediana y grande, se encuentra en las entradas de las tierras altas de México, los Andes, África Central y Oriental, Europa y países del occidente Asiático (Singh *et al.*, 1991a; 1991b).

La base genética de los cultivares comerciales de caraota utilizados en Venezuela es bastante estrecha, por lo que la variabilidad genética presente en los Bancos de Germoplasma es limitada. En este sentido, se considera de importancia primordial el rescate de las variedades locales y materiales nativos, con el fin de preservar la diversidad y hacer uso de estos acervos genéticos en la ampliación de la base genética de los cultivares comerciales, así como en la búsqueda de alternativas para los sistemas de producción actualmente en uso.

Los marcadores moleculares son una importante herramienta para estudiar los patrones de domesticación del género *Phaseolus* y de muchos otros géneros (Debouck *et al.*, 1993). El desarrollo de técnicas para manipular y analizar el ADN ha sido muy veloz en los últimos años y el frijol común (caraota) es un buen candidato para aplicar estas estrategias, ya que su genoma es relativamente pequeño (0,65 pb/genoma haploide). Uno de los retos en el éxito de estas técnicas es la obtención de una alta calidad de ADN de alto peso molecular (Sánchez *et al.*, 1995).

En un estudio sobre la diversidad en caraota, Singh *et al.* (1991b) demuestran que los análisis moleculares, junto con evaluaciones morfológicas y agronómicas, proveen información complementaria e incrementan el poder de resolución de los análisis de diversidad genética. Estos autores, luego de realizar la caracterización morfológica y agronómica de 306 tipos o razas nativas de Latinoamérica, analizaron sus relaciones con la proteína faseolina y la diversidad de aloenzimas, lo que permitió separar a los grupos Mesoamericano y Andino.

Los marcadores RAPDs se fundamentan en la amplificación de secuencias aleatorias de ADN, usando iniciadores arbitrarios en la PCR (Williams *et al.*, 1990). Las ventajas de esta técnica son la simplicidad, rapidez y el requerimiento de sólo pequeñas cantidades de ADN genómico (Welsh y McClelland, 1990; Freyre *et al.*, 1996).

Esta técnica molecular se utilizó con mucho éxito en la determinación de la estructura genética del género *Phaseolus*; desde el estudio sobre los centros de origen y de diversidad (Kaplan, 1965; Beebe *et al.*, 1995; Beebe *et al.*, 2000; Beebe *et al.*, 2001) hasta el conocimiento de la variabilidad entre tipos comerciales o líneas mejoradas (Métais *et al.*, 2000; Constabel *et al.*, 1996; Karp A., 2002.).

De manera que los marcadores RAPD se utilizaron en estudios de diversidad a diferentes niveles taxonómicos, desde comparación de genomas entre especies (Quirós *et al.*, 1991), de genotipos de una especie o género (Fofana *et al.*, 1997; Freyre *et al.*, 1996; Vekemans *et al.*, 1998; Koenig *et al.*, 1990; Koinange *et al.*, 1996) y aun para estudiar la diversidad entre cultivares dentro de un cultivo (Yang y Quirós, 1993; Mailer *et al.*, 1994).

Algunos trabajos sirven como base a los argumentos actuales sobre el origen de la caraota, teniendo a *Phaseolus aborigineus* como ancestro silvestre, cuyo proceso de domesticación se conoce que tuvo lugar en el Centro y Sur de América. De hecho, las muestras se han colectado en Venezuela, y existen excicatas en Herbarios Nacionales, tal como, el Herbario del Jardín Botánico de la Universidad Central de Venezuela.

Por otra parte, en 1966 se reportó que en las montañas de Mérida se utilizaba esta especie como alimento por parte de las familias más pobres, costumbre que también era común en Pamplona, Colombia (Brucher y Brucher, 1976).

Jaffé y Karl (1959) y Jaffé y Brucher (1968), realizaron comparaciones del contenido de fitohemaglutinina entre la caraota y *P. aborigineus* colectados en los andes venezolanos, para establecer relaciones taxonómicas entre estas dos especies.

Freyre *et al.* (1996), utilizando análisis de faseolina y marcadores bioquímicos y moleculares (isoenzimas y RFLP), pudieron distinguir dos grupos de *Phaseolus* procedentes de Bolivia; uno Andino y otro Mesoamericano; también identificaron un tercer grupo intermedio que se encuentra en el noroeste de Sur América.

Además, determinaron las relaciones genéticas de materiales silvestres de caraota, utilizando RAPDs, y correlacionaron la información obtenida a través del uso de esta técnica con el origen geográfico de los materiales y con información de previas caracterizaciones bioquímicas y moleculares.

Esta correlación resultó muy alta y además aseguran que el análisis permite obtener un gran número de bandas, logrando una mayor sensibilidad para la identificación de sub-grupos geográficos y materiales de origen híbrido.

Los marcadores RAPDs mostraron variabilidad entre y dentro los dos principales pools genéticos (Andino y Mesoamericano) (Haley *et al.*, 1994; Mitrick *et al.*, 1995). Esto fue también probado con material genético proveniente de Chile (Mitrick *et al.*, 1995) y de Bolivia (Freyre *et al.*, 1996).

En décadas recientes, se ha asignado especial énfasis a la constitución y mantenimiento de colecciones de germoplasma muy grandes en el caso de cultivos de importancia. Sin embargo, la evaluación de éstas, solo es factible si se cuenta con características discriminantes sencillas. Se conoce que los investigadores en mejoramiento de plantas requieren de evaluaciones repetidas en campo, por lo que las colecciones deben ser muestreadas, bien sea al azar o bajo algún criterio preestablecido, en respuesta a la necesidad de una evaluación efectiva de tan grandes colecciones, para lo que se han propuesto las "core collections" (o colecciones centrales), las cuales incorporan una muestra representativa de la variabilidad presente del cultivo con un mínimo de redundancia.

También, Beebe *et al.* (2000) analizaron una colección de 269 tipos locales o landraces de caraota, mediante un análisis de correspondencia de marcadores RAPDs, para determinar la estructura genética del acervo genético del grupo Mesoamericano del que proviene 60% de los cultivares comerciales utilizados en el mundo. Con el uso de esta técnica molecular, los autores pudieron profundizar en el conocimiento de las relaciones genéticas entre y dentro de las tres razas del pool Mesoamericano (Mesoamérica, Durango y Jalisco).

Además, determinaron que numeroso del germoplasma cumple con la descripción de las tres razas, el grupo Mesoamericano es más complejo, especialmente las regiones que incluyen Guatemala y los estados de Oaxaca y Chiapas en México, donde se encuentra una importante diversidad genética que aún no ha sido apropiadamente estudiada. Por otra parte, en el eje volcánico del este de México puede haber una fuente de variabilidad que no ha sido explotada.

Beebe *et al.* (2001) realizaron posteriormente un estudio con tipos locales o landraces del pool Andino, tomando una submuestra de la colección del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); en este caso, se demostró

que la base genética del grupo Andino, conservado en el banco, es bastante estrecha en contraste con el grupo Mesoamericano.

Si bien las razas de Nueva Granada, Perú y Chile del pool Andino se conformaron con base en características morfológicas y de adaptación, las técnicas moleculares demostraron que estas tienen un origen común, por lo que se infiere que las diferencias entre ellas son el resultado de la intensiva selección humana, especialmente para ciertos caracteres como color y tamaño de la semilla.

En otro trabajo se ha realizado el análisis de la diversidad genética entre germoplasma mejorado o líneas comerciales a través de perfiles RAPDs que permitieron diferenciar 24 líneas comerciales con siete primers (Métais *et al.*, 2000).

Muchos ensayos se realizan para identificar marcadores RAPDs asociados a loci de características cuantitativas (siglas en inglés, QTL; Lowe *et al.*, 1996), relacionadas a resistencias a enfermedades en caraota como el moho blanco, *Sclerotinia* sp. (Park *et al.*, 2001; Miklas *et al.*, 2001; Faleiro *et al.*, 2000), *Fusarium* (Fall *et al.*, 2001), mancha angular, *Phaeoisariopsis griseola* (Ferreira *et al.*, 2000), anthracosis, *Colletotrichum lindemuthianum* (Adam-Blondon *et al.*, 1999), bacteriosis (Constabel *et al.*, 1996), mancha Blanca (Milkas *et al.*, 2001) y otras.

En la literatura no se encuentra coincidencia en cuanto a los primers más adecuados para los estudios en el género *Phaseolus*. Se puede destacar la utilización de los primers OPA-06, OPA-08, OPA-10, OPA-20, OPC-19, OPD-08, OPD-12, OPE-08, OPE-15, OPE-16, OPE-19 y OPE-20 para clasificar materiales nativos y los primers OPA-02, OPA-03, OPA-08, OPA-12, OPC-19, OPD-01, OPD-05, OPD-12, OPD-16 y OPE-08 en el estudio de materiales cultivados de caraota llevado a cabo por Fofana *et al.* (1998).

En estudios sobre la domesticación del género se han utilizado los primers Operon C08, H12, H18, H20, I06, J09, N06, N12, M10, U10, U15, W20 (Skroch *et al.* 1998) y B10, F10, G03, G05, I16, I06, I07, L04, M12, O13, O15, O16, P01, P09, Q09, Q14, R04, R09, T07, U01, U19, W02, W06, W07, W09, X01 y X11 (Skroch *et al.*, 1998; Nowosielski *et al.*, 2002).

La presente investigación facilitará los trabajos de mejoramiento genético, al incrementar la disponibilidad de germoplasma de diversos acervos genéticos debidamente caracterizados y evaluados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con un grupo de genotipos conformado por un total de 22 materiales, de los cuales 19 provienen de diversas localidades del país que fueron introducidos al Banco de Germoplasma del INIA-CENIAP (Cuadro 1). Una línea de mejoramiento donada por el investigador Alberto Salih (línea experimental 13) y dos cultivares comerciales utilizados como testigos (Tacarigua y Montalbán). Estos materiales fueron previamente evaluados en campo para determinar su tolerancia al déficit hídrico (Gutiérrez, 2009).

### Siembra de los materiales

Se sembraron todos los materiales en bolsas negras y fueron ubicados en el cobertizo del edificio 08, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) del INIA, Maracay, estado Aragua, a los fines de cosechar el segundo par de hojas verdaderas, totalmente expandidas.

### Extracción del ADN

Para la extracción del ADN, se seleccionó tejido fresco de hojas sanas sin pecíolo. Se aisló el ADN, siguiendo el protocolo propuesto por Zambrano *et al.* (2002).

### Reacción de amplificación

La mezcla de reacción se efectuó en un volumen final de 25 µl, y estuvo compuesta por Taq polimerasa 1U, Buffer B 1X, Cloruro de magnesio (2,5 mM), DNTPs 1.2 mM, primers 0,2 mM (Cuadro 2), BSA (0,01 g ml<sup>-1</sup>) y agua destilada hasta completar el volumen deseado.

### Ciclos PCR

Los ciclos PCR se efectuaron en un termociclador modelo Gene E (THECHNE). El programa de amplificación seleccionado consistió en los siguientes perfiles de temperatura: 95 °C por 2,5 min, cuatro ciclos cada uno con un segmento de desnaturalización a 94 °C por 1 min, uno de "anilling" o "pegue" a 62 °C por 1 min y uno de extensión a 65 °C por 10 min, seguido de 26 ciclos de desnaturalización, cada uno por 30 seg a 95 °C, 1 min a 62 °C de anilling y dos ciclos seguidos de extensión de 10 min y 65° C, cada uno. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa 1%, usando el buffer Tris-borato teñido con bromuro de Etidio y escaneados y grabados con el programa Quantity One.

**CUADRO 1.** Procedencia de los 22 cultivares incluidos en el experimento.

| N° | Nombre vulgar                         | Procedencia                    | Estado   | Altura<br>m.s.n.m. | Latitud   | Longitud  | Donante                      |
|----|---------------------------------------|--------------------------------|----------|--------------------|-----------|-----------|------------------------------|
| 1  | Caraota negra                         | Mercado de Carúpano            | Sucre    | 15                 | 10°39'57" | 63°14'59" | Rosa Elena Brazón            |
| 2  | La poncha                             | Río Cocollar                   | Monagas  | 673                | 10°09'00" | 63°14'59" | Juan Suárez                  |
| 3  | Caraota roja                          | Las Delicias de Río Cocollar   | Monagas  | 673                | 10°09'00" | 63°14'59" | Inés Duarte                  |
| 4  | Caraota negra                         | La Horqueta                    | Sucre    | 573                | 10°22'00" | 63°14'59" | Vicenta García Figueroa      |
| 5  | Tocoquita negra                       | Santa María, municipio Cariaco | Sucre    | 925                | 10°17'00" | 63°14'59" | José Ramón Cova              |
| 6  | Caraota de bejuco                     | Altamira de Cáceres            | Barinas  | 833                | 08°49'22" | 63°14'59" | José Gerónimo Rivas          |
| 7  | Caraota negra                         | El Caney de Pueblo Llano       | Mérida   | 1 628              | 08°53'23" | 63°14'59" | Elis Vergara                 |
| 8  | De picar                              | Los Tendales de Mutús          | Mérida   | 2 433              | 08°55'14" | 63°14'59" | Ana Julia Alarcón            |
| 9  | Roja pintada cuarentana               | San José de Acequias           | Mérida   | 1 148              | 08°24'19" | 63°14'59" | Agricultores pueblos del Sur |
| 10 | Caraota rosada                        | Pueblo Nuevo                   | Mérida   | 1 477              | 08°27'25" | 63°14'59" | Agricultores pueblos del Sur |
| 11 | Poncha                                | Quibor, municipio Jiménez      | Lara     | 550                | 09°54'54" | 63°14'59" | Marco Escalona               |
| 12 | Caraota negra                         | Eneal Sogarito                 | Lara     | 436                | 09°45'04" | 63°14'59" | Evarista Cordero             |
| 13 | Plomito                               | Palo Verde, Sanare             | Lara     | 345                | 09°46'06" | 63°14'59" | Remingo A. Torres            |
| 14 | Rayada                                | Palo Verde, Sanare             | Lara     | 357                | 09°46'06" | 63°14'59" | Remigio A. Torres            |
| 15 | Rayada                                | Miracuy, municipio Andrés Eloy | Lara     | 776                | 09°38'51" | 63°14'59" | Hipólito Gutiérrez           |
| 16 | Caraota negra criolla                 | Mercado principal de Maracay   | Aragua   | 446                | 10°17'57" | 63°14'59" | Vendedor                     |
| 17 | Vaina blanca                          | Santa Rosa del Sur, La Villa   | Carabobo | 1 200              | 09°57'24" | 63°14'59" | Finca Uvitas                 |
| 18 | Guaimara o guaimarito<br>vaina Blanca | Bajo de Guanape                | Miranda  | 1 455              | 09°56'21" | 63°14'59" | Material local               |
| 19 | Caraota negra de macaira              | San Rafael de Orituco          | Guárico  | 60                 | 09°49'21" | 63°14'59" | Bodega San Rafael de Orituco |
| 20 | Línea experimental 13                 | Línea mejorada INIA            | Aragua   | 455                | 10°17'57" | 63°14'59" | Mejorador Alberto Salih INIA |
| 21 | Tacarigua                             | Variedad comercial             | Aragua   | 455                | 10°17'57" | 63°14'59" | Mejorador Simón Ortega INIA  |
| 22 | Montalbán                             | Variedad comercial             | Aragua   | 455                | 10°17'57" | 63°14'59" | Mejorador Simón Ortega INIA  |

**CUADRO 2.** Primers utilizados para la caracterización.

| Primers | Secuencia        |
|---------|------------------|
| OP M16  | 5'-GTAACCAGCC-3' |
| OP Y07  | 5'-AGAGCCGTCA-3' |
| OP Y04  | 5'-GGCTGCAATG-3' |
| OP M20  | 5'-AGGTCTTGGG-3' |
| OP A07  | 5'-GAAACGGGTG-3' |
| OP Y17  | 5'-GACGTGGTGA-3' |

**Análisis estadístico de los resultados de la caracterización molecular**

Se utilizó el coeficiente de asociación de Dice (1945). Los coeficientes de asociación se obtienen a partir de caracteres binarios, codificados como "1" y "0". Esta nomenclatura es utilizada para expresar la presencia versus la ausencia de una banda.

Las posibles combinaciones se observan en el Cuadro 3.

**CUADRO 3.** Matriz de asociación de Dice (1945).

|     |   | UBJ |     |           |  |
|-----|---|-----|-----|-----------|--|
| UBK | 1 | 0   |     |           |  |
|     | 0 | A   | B   | a+b       |  |
|     |   | C   | D   | c+d       |  |
|     |   | a+c | b+d | n=a+b+c+d |  |

En el caso del coeficiente de Dice (1945), el cálculo otorga el doble de importancia a los apareamientos positivos (a) que a los negativos (d) ya que se calcula de la manera siguiente:

$$Sd = 2a / (2a + b + c)$$

Una vez obtenidos los patrones de fragmentos de amplificación, la información se organizó por presencia (1) y ausencia de bandas (0), lo cual permite obtener la matriz básica binaria.

Para identificar el agrupamiento natural de las entradas, se preparan diferentes combinaciones de coeficientes de similitud y/o distancias bajo distintos métodos de agrupamiento, utilizando la prueba de Mantel o el Coeficiente de Correlación Cofenética como criterio para seleccionar uno de los agrupamientos probados por coeficiente de similitud.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se realizó el análisis para el conjunto de los iniciadores haciendo uso del programa estadístico WinStat, del cual se utilizó la salida de los dendogramas de clasificación, a los fines de la presentación de este trabajo.

El uso de los iniciadores OPM-16, OPY-07, OPY-04, OPM-20, OPA-07, OPY-17 produjo un total de 47 fragmentos de amplificación reproducible, siendo el OPA-07 y el OPY-17 los que generaron el mayor número de fragmentos polimórficos, con un total de ocho.

En la Figura 1 se observa la prueba de amplificación de genotipos con los diversos primers probados.

El contenido de la información polimórfica promedio fue 0,244 +/- 0,009 con valores mínimos de 0,1428 y máximos de 0,968. La Figura 2 muestra el dendograma con las relaciones genéticas entre los materiales nativos y cultivados estudiados, utilizando el criterio de agregación UPGMA y coeficiente de similitud de Dice.

El análisis de los datos permitió la conformación de seis grupos de materiales, haciendo el corte del árbol a 0,5 unidades ultra métricas (UUM).

En el grupo I se ubicó el cultivar Tacarigua, que es la variedad comercial mejorada por el INIA y sembrada en mayor proporción por los agricultores en el país. Resulta interesante que el análisis permitió separar a este del resto de los materiales colectados en Venezuela, dado que se puede inferir que los tipos locales conservados por los agricultores son genéticamente diferentes al testigo comercial, razón que justifica la colecta y conservación como parte de las estrategias a seguir para la ampliación de la base genética de los cultivares comerciales venezolanos.

El grupo II, también conformado por un solo cultivar, permitió separar al único individuo proveniente del estado Mérida (genotipo 10), de color rosado.

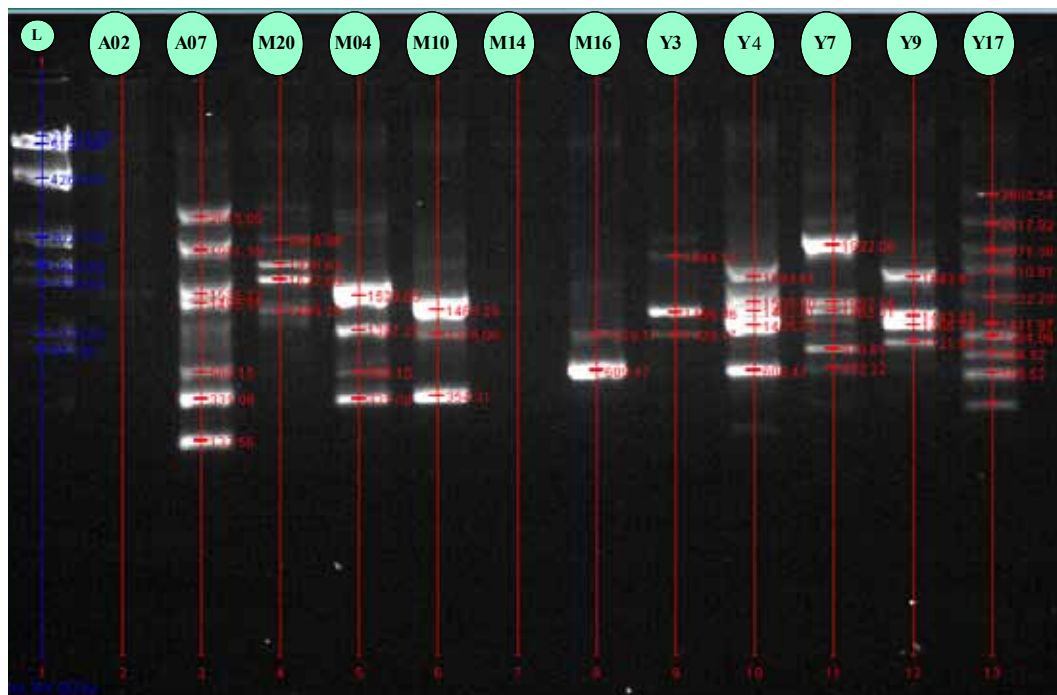


FIGURA 1. Prueba de 12 iniciadores, genotipo 12 a.

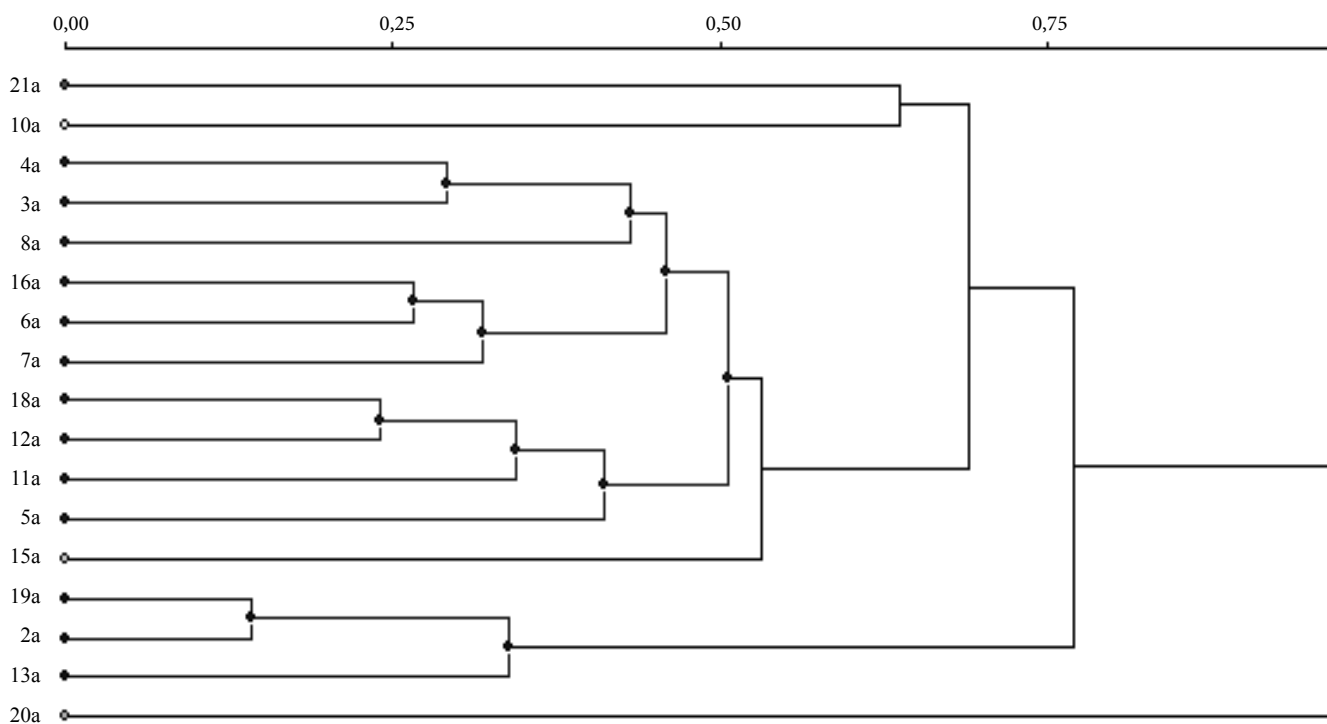


FIGURA 2. Clasificación jerárquica ascendente de materiales nativos y comerciales de caraota con base a la técnica RAPD utilizando los iniciadores: OPM-16, OPY-07, OPY-04, OPM-20, OPA-07 y OPY-17.

Cabe destacar, que este material rosado es de gran tamaño, típicamente consumido en los andes Venezolanos y parece pertenecer al acervo genético del grupo Andino, si se toman en cuenta las características distintivas de estos tipos (Haley *et al.*, 1994; Mitrick *et al.*, 1995).

El grupo III está conformado por 10 materiales provenientes de diversas zonas y en su mayoría de color negro y tamaño pequeño, la caraota típica consumida en todo el territorio. Sin embargo, en este grupo existe un material (genotipo 3) que es de color rojo, procedente del estado Monagas, el cual no coincide en sus características morfológicas con el resto del grupo.

El grupo IV solo incluye un material originario del estado Lara (genotipo 15), que se caracteriza, a diferencia del resto de los materiales evaluados en el presente estudio, por ser de grano rayado.

El grupo V compuesto por los materiales 19, 13 y 2, de las cuales dos son negras y una blanca, de los estados Guárico, Lara y Monagas, respectivamente. En el caso de este grupo se puede mencionar que morfológicamente coinciden sólo en que son de pequeño tamaño de grano.

En el VI y último grupo, resulta interesante que solo se encuentra la línea mejorada por el investigador Alberto Salih del INIA-CENIAP (Línea experimental N° 13). Este material identificado como 20, se ubica en el extremo opuesto (la mayor distancia encontrada en el estudio) del testigo comercial Tacarigua. Este resultado permite inferir que el material es genéticamente distante del utilizado comercialmente en la actualidad, lo cual representa una importante ventaja para su selección como alternativa a los sistemas de producción, lográndose entre otras cosas disminuir la vulnerabilidad ante condiciones adversas de los materiales en el mercado, que son de conocida estrecha base genética (Voystest, 2000).

Sobre la base de la conformación de estos grupos se propone una alternativa para mejorar cultivares de color negro a partir de cruzamientos de la variedad Tacarigua, ubicada en el grupo I, con los genotipos de color negro 19 y 13. Éstos, también alcanzaron rendimientos medios aritméticos y geométricos muy superiores a ambos testigos comerciales (Gutiérrez, 2009) y se clasificaron en el grupo V, ubicado a una distancia genética cercana a 0,75 UUM del grupo I.

Asimismo, se podría cruzar al genotipo 20, línea mejorada 13, clasificado en el grupo VI, con los genotipos negros 6 y 12, ambos con altos rendimientos (Gutiérrez, 2009) y clasificados en el grupo

III, distante en 0,75 UUM del grupo VI. Si el objetivo estuviese centrado en comportamiento superior ante condiciones de déficit hídrico, es recomendable hacer el cruce con el genotipo 12, por haber presentado un bajo índice de susceptibilidad a la sequía.

En el caso de un programa de mejora de genotipos de color, se recomienda el cruce del genotipo 10 de color rosado y ubicado en el grupo II con el genotipo 2 de color blanco clasificado en el grupo V. En este caso la distancia genética de los grupos II y V es cercana a las 0,60 UUM.

## CONCLUSIONES

- Se puede proponer un trabajo de mejora genética, teniendo como base los seis grupos conformados, incluyendo la ampliación de la base genética de los cultivares estudiados.
- La conformación de los seis grupos mediante este análisis resulta de mucha utilidad a los fines de proponer un trabajo de mejora genética que incluya la ampliación de la base genética de los cultivares.
- Se considera adecuado mejorar cultivares de color negro, partiendo del cruzamiento de Tacarigua con los genotipos de color negro 19 y 13; así como cruzar la línea mejorada 13 con los genotipos negros 6 y 12.
- Para la mejora de genotipos de color se recomienda el cruce del genotipo 10 (rosado) con el genotipo 2 (de color blanco).
- Se estima conveniente que se generen poblaciones mejoradas a partir del cruzamiento de genotipos genéticamente distantes de acuerdo a esta clasificación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adam-Blondon, A. F., M. Seignac, M. Dron and H. Bannerot. 1999. A genetic map of common bean to localize specific resistance genes against anthracnose. Plant genome II Conference "International Plant Genome Conference". Thematic items Fifth PHASELIEU Workshop. Town & Country Conference Center, San Diego, CA. Genome 37:915-924
- Beebe, S. E., I. Ochoa, P. Skroch, J. Nienhuis and J. Tivang. 1995. Genetic Diversity among common



- bean breeding lines developed for Central América. *Crop Sci.* 35(5):1 178-1 183.
- Beebe, S., P. W. Skroch, J. Thome, M. C. Duque, F. Pedraza and J. Nienhuis. 2000. Structure of genetic diversity among common bean landraces of middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop Sci.*, 40(1):264-273.
- Beebe, S., J. Rengifo, E. Gaitan, M. C. Duque and J. Thome. 2001. Diversity and Origin of Andean Landraces of Common Bean. *Crop Science*. 41:854-862.
- Berthaud, J. 1997. Strategies for conservation of genetic resources in relation with their utilization. *Euphytica*. 96:1-12.
- Brucher, O. B. and H. Brucher. 1976. The South American wild bean (*Phaseolus aborigeus* Burk.) as ancestor of the common bean. *Economic Botany*. 30(3):257-272.
- Constabel, E. C., T. E. Michaels, P. H. Goodwin, J. E. Mayer and M. A. Pastor. 1996. Evaluation of a DNA probe for the quantitative detection of common bacterial blight in common bean and its application in a verdín program. *Euphytica*. 90:129-135.
- Debouck, D. G., O. Toro, O. M. Paredes, W. C. Johnson and P. Gepts. 1993. Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) in northwestern South America. *Economic Botany*, 47(4):408-423.
- Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*. 26:297-302.
- Faleiro, F. G., W. S. Vinhadelli, V. A. Ragagnin, R. X. Correa, M. A. Moreira and E. G. de Barros. 2000. RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. *Genet. Mol. Biol.* 23(2):399-402.
- Fall, A. L., P. F. Byrne, G. Jung, D. P. Coyne, M. A. Brick and H. F. Schwartz. 2001. Detection and mapping of a major locus for *Fusarium* wilt resistance in common bean. *Crop Science*, 41:1494-1498.
- Ferreira da Silva, G., J. B. dos Santos and M. A. Patto. 2003. Identification of SSR and RAPD markers linked to a resistance allele for angular leaf spot in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) line ESAL 550. *Genetics and Molecular Biology*. 26(4):459-463.
- Ferreira, C. F., A. Borém, G. A. Carvalho, S. Nietsche, T. J. Paula Jr., E. G. Barros and M. A. Moreira. 2000. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of a RAPD marker linked to a resistance gene. *Crop Science*. 40:1 130-1 133.
- Fofana, B. J. P., J. P. Baudion and P. du Jardin. 1998. Molecular phylogeny in the genus *Phaseolus*. 3rd European Conference on Grain Legumes. Opportunities for high quality, healthy and added-value crops to meet European demands. Valladolid, España. 214-215 pp.
- Fofana, B., X. Vekemans, P. du Jardin and J. P. Baudion. 1997. Genetic Diversity in Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) as revealed by RAPD markers. *Euphytica*, 95:157-165.
- Freyre, R., R. Rios; L. Guzman, D. G. Debouck and P. Gepts. 1996. Ecogeographic distribution of *Phaseolus* spp. (Fabaceae) in Bolivia. *Economic Botany*. 50(2):195-216.
- Gutiérrez, M. 2009. Caracterización ecofisiológica y molecular de materiales locales de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) colectados en Venezuela, ante condiciones de déficit hídrico. Tesis de grado para optar al título de Doctora en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de Venezuela. 69 p.
- Haley, S. D., P. N. Miklas, L. Afanador and J. D. Kelly. 1994. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker variability between and within gene pools of common bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119:122-125.
- Jaffé, W. G. and G. Karl. 1959. Purification of a toxic phytohaemagglutinin from Black Beans (*Phaseolus vulgaris*). *Nature*. 183:1 329-1 330.
- Jaffé, W. G. and K. Hannig. 1965. Fractionation of proteins from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Arch. Biochem. Biophys.* 109:80-91.
- Jaffé, W. G. y O. Brucher. 1968. La Presencia de fitohemaglutinina en *Phaseolus aborigineus* (Burk) y su identidad con la de *Phaseolus vulgaris* L. como argumento quimiotaxonómico de la íntima relación de estas dos especies. *Rev. Acta Científica Venezolana*. 19:20.

- Karp, A. 2002. The new genetic era: will it help us in managing genetic diversity. In managing plant genetic diversity. Edited by J. M. M. Engels, V. Ramana Rao, A. H. D. Brown and M. T. Jackson. CABI Publishing. 487 p.
- Kaplan, L. 1965. Archeology and domestication in American *Phaseolus* (Bean). *Econ. Bot.* (19):358-368.
- Koenig, R. L., S. P. Singh and P. Gepts. 1990. Novel Phaseolin Types in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany*, 44(1):50-60.
- Koinange, E. M., S. Singh and P. Gepts. 1996. Genetics control of the domestication syndrome in common bean. *Crop Sci*, 36:1 037-1 045.
- Lowe, A. J., O. Hanotte and L. Guarino. 1996. Standardization of molecular genetic techniques for the characterization of germplasm collections: the case of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genetic Resources Newsletter*, 107:50-54.
- Mailer, R. D., R. Scarth and B. Fristensky. 1994. Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus*) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theoretical and Applied Genetics*, 87:697-704.
- Métias, I., C. Aubry, B. Hamon, R. Jalouzot and D. Peltier. 2000. Description and analysis of genetic diversity between commercial bean lines (*Phaseolus vulgaris*). *Theoretical and Applied Genetics*, 101(8):1 207-1 214.
- Miklas, P. N., W. C. Johnson and R. Delorme and P. Gepts. 2001. QTL Conditioning Physiological Resistance and Avoidance to White Mold in Dry Bean. *Science*. 41:309-315.
- Mitrick, J. A., J. Nienhuis, P. Hinrichsen and C. Muñoz. 1995. RAPID Analysis of *Phaseolus vulgaris* landrace from Chile. Department of Biological Science Northern Illinois University De Kalb, Department of Horticulture, University of Wisconsin, Madison, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Santiago, Chile, Plant Genome III, January 1995.
- Nowosielski, J., W. Podyma and D. Nowosielska. 2002. Molecular research on the genetic diversity of Polish varieties and landraces of *Phaseolus coccineus* L. and *Phaseolus vulgaris* L. using the RAPD and AFLP methods. *Cell Mol Biol Lett*, 7(2B):753-762.
- Park, Soon O., D. P. Coyne, J. R. Steadman and P. W. Skroch. 2001. Mapping of QTL for Resistance Mold Disease in Common Bean. *Crop Science*, 41:1 253-1 262.
- Quirós, C. F., J. Hu, P. This, A. M. Chevre and M. Del-seny. 1991. Development and chromosomal localization of genome-specific markers by the polymerase chain reaction. *Theoretical and Applied Genetics*, 82:627-632.
- Sánchez, M., S. Hernández, P. Guzman and J. Simpson. 1995. A simple protocol for the isolation of High Molecular Weight DNA Molecular from Common Bean (*P. vulgaris*). Department of Genetic Engineering. Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Irapuato Apdo Postal 629, Irapuato México.
- Sing, S. P., P. Gepts and D. G. Debouck. 1991a. Races of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economy Botanic*, 45(3):79-396.
- Sing, S. P., J. A. Gutiérrez, A. Molina, C. Urrea and P. Gepts. 1991b. Genetic Diversity in Common Bean: II. Marked-Based Analysis of Morphological and Agronomics Traits. *Crop Sciece*, 31:23-29.
- Skroch Paul, W., J. Nienhuis, S. Beebe, J. Thome and F. Pedraza. 1998. Comparison of Mexican Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Core and Reserve Germplasm Collections. *Crop Science*, 38:488-496.
- Vekemans, X., O. Hardy, B. Berken, B. Fofana and J. Baudoin. 1998. Use of PCR-RFLP on chloroplast DNA to investigate phylogenetic realltionships in the genus *Phaseolus*. *Biotechnologie, Agronomie Societe et Environnement*. 2(2):128-134.
- Voysest, O. 2000. Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Legado de variedades de América Latina 1930-1999. Centro Internacional de Agricultura Trop. Cali Colombia. 195 p.
- Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18(24):7 213-7 218
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22):6 531-6 535.

Yang, X. and C. Quiros. 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 86:205-212.

Zambrano, A. Y., J. R. Demey, G. Martínez, F. Fuenmayor, Z. Gutiérrez, G. Saldaña y M. Torrealba. 2002. Método rápido, económico y confiable de mini preparación de ADN para amplificaciones por Rapd en bancos de germoplasma. *Agronomía Trop.*, 52(2):235-243.