

# INVESTIGACIONES

## ESTUDIO COMPARATIVO DE DIVERSIDAD MORFOLÓGICA, ISOENZIMÁTICA Y RAPDs DENTRO Y ENTRE CLASES COMERCIALES DE FREJOL CHILENO (*Phaseolus vulgaris* L.)<sup>1</sup>

Comparative study of morphology, isozyme and RAPD diversity among and within commercial classes of common Chilean beans (*Phaseolus vulgaris* L.)

Claudio Vera M.<sup>2</sup>, Mario Paredes C.<sup>3</sup> y Viviana Becerra V.<sup>3</sup>

### ABSTRACT

Fifty-two accessions of nine commercial types of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) belonging to the Chilean strain were evaluated. The objectives of this study were to characterize and genetically identify the principal commercial classes, local selections and better varieties of Chilean beans by means of isozymes and RAPDs, and to compare these results with the morphological and agricultural characterization of the selected genotypes. The morphological analysis included 22 characteristics, the biochemical analysis 11 isozyme systems, and the molecular analysis 38 primers. The results indicated that the color of the bean is the only characteristic able to distinguish between commercial classes. On the other hand, the isozyme and RAPDs were not able to group the genotypes in accordance with the commercial classes. The genetic diversity within each commercial class was fairly tight for the traits analyzed with the degree of similarity reaching 100% in some cases. Among the commercial classes, the Tórtola showed the greatest similarity (98%), while the most disparate commercial classes were the Coscorrón, Sapito and Cuyano, with 95% similarity. It was determined that some of the enzyme systems and specific primers could complement the morphological and agricultural identification to be used in discriminating between varieties.

**Key words:** Genetic diversity, market classes, isozymes, RAPD.

### INTRODUCCIÓN

La integración de estudios morfológicos, agronómicos, bioquímicos y moleculares ha sido importante en los estudios de evolución y de caracterización del frejol común *Phaseolus vulgaris*

L. Desde el punto de vista bioquímico y molecular, el frejol común ha sido investigado a nivel de faseolina (Gepts y Bliss, 1986), isoenzimas (Singh *et al.*, 1991), fragmentos de restricción polimórficos (RFLPs) (Becerra y Gepts, 1994), amplificación ADN al azar (RAPDs) (Johns *et al.*, 1997) y recientemente mediante amplificación de fragmentos polimórficos (AFLPs) (Tohme *et al.*, 1996). Todos estos trabajos han confirmado la existencia de dos centros principales de origen y domesticación de esta especie, uno ubicado en la región Meso Americana y otro en la zona Andina.

<sup>1</sup>Recepción de originales: 27 de agosto de 1998.

<sup>2</sup>Parte tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad Adventista de Chile, Facultad de Agronomía, Casilla 7 - D, Chillán, Chile.

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Casilla 426, Chillán, Chile. E-mail: mparedes@quilamapu.inia.cl

Dentro del pool genético Mesoamericano es posible distinguir tres razas de frejol cultivado: Jalisco, Mesoamerica y Durango. En la región Andina se distinguen tres razas cultivadas: Nueva Granada, Perú y Chile (Singh *et al.*, 1991). También se postula la existencia de un centro secundario ubicado entre el sur de Ecuador y el norte de Perú (Debouck *et al.*, 1993 ; Debouck, 1996), o la presencia de nuevos centros, uno ubicado en Colombia y otro en la zona sur de Ecuador y norte de Perú (Tohme *et al.*, 1996).

Dentro de cada pool de genes del frejol cultivado la variabilidad genética es alta para características agronómicas. Sin embargo, debido a la fuerte presión de selección ejercida durante el proceso de domesticación y al sistema reproductivo de la especie, la diversidad genética a nivel bioquímico y molecular ha disminuido si se compara con especies silvestres (Sonnante *et al.*, 1994; Becerra y Gepts, 1994; Gepts *et al.*, 1993).

Diversos estudios (Gepts y Bliss, 1986; Singh *et al.*, 1991; Becerra y Gepts, 1994; Paredes y Gepts, 1995; Johns *et al.*, 1997) indican que los frejoles pertenecientes a la raza Chile tienen las siguientes características bioquímicas, moleculares y morfológicas. Poseen faseolina tipo 'C', 'T' y 'H' características del pool de genes Andino. Sin embargo, estudios recientes han detectado también presencia de introgresión de faseolina tipo 'S' y algunas aloenzimas características del pool Mesoamericano. El frejol chileno se caracteriza también por la presencia de una alta frecuencia de la aloenzima *Mdh*<sup>100</sup>, y escasa diversidad genética a nivel de marcadores moleculares como RFLP y RAPDs. Desde el punto de vista morfológico, los genotipos tradicionales poseen hojas pequeñas, elongadas o romboides; bractéolas triangulares y estrechas; flores de color rosado pálido o blanco; vainas medianas, con poca fibra; semillas redondas u ovals con tres a cinco semillas por vaina; hábito de crecimiento postrado; susceptible al mosaico común, mosaico amarillo, mosaico de la alfalfa y mosaico del pepino; precocidad intermedia a tardía y un potencial de rendimiento menor a 2.000 kg ha<sup>-1</sup>.

En nuestro país, la producción de frejol se realiza en base a selecciones locales y variedades mejoradas. Este material genético es clasificado en clases comerciales que se destinan al consumo interno (Tórtolas, Coscorrón, Mantecas y Suaves) y al mercado externo (Bayos, Frutillas Negros y Blancos).

De las variedades chilenas las clases comerciales Tórtola, Coscorrón, Manteca y Suaves, son consideradas únicas en el mundo. De estas clases comerciales, los Tórtola y Coscorrón son los tipos de frejol más demandados en el mercado interno, como grano seco y granado, respectivamente (Paredes, 1994; 1995).

En los últimos años se han realizado estudios tendientes a determinar la diversidad genética del frejol, donde se han incluido algunas accesiones de frejol chileno (Gepts y Bliss, 1986; Singh *et al.*, 1991; Becerra y Gepts, 1994). Recientemente, se ha publicado un par de estudios más específicos sobre la raza Chile (Paredes y Gepts, 1995; Johns *et al.*, 1997). Sin embargo, no existen estudios tendientes a caracterizar genéticamente las diferentes clases y variedades comerciales que constituyen la raza Chile. La caracterización genética de selecciones locales y variedades es muy importante en la mantención de la pureza genética, identificación, propiedad del germoplasma evaluado y en la estimación de algunas relaciones genéticas.

Tradicionalmente, la descripción de la variabilidad genética e identificación varietal en frejol consistía en la descripción morfológica del germoplasma y del cultivar en particular. Actualmente, a estos estudios se han incorporado otras características como las bioquímicas y moleculares (Stephen *et al.*, 1995) que pueden complementar la descripción fenotípica tradicional del germoplasma. De los tres tipos de análisis mencionados anteriormente, la caracterización morfológica entrega información fenotípica del cultivar, lo cual integra la expresión genética más la influencia ambiental, mientras que la caracterización bioquímica y molecular (faseo-

lina, isoenzimas, RFLP, RAPD, AFLP y micro-satélites) caracterizan el genotipo, por lo cual son mucho más exactos y estables que los marcadores morfológicos (Gepts *et al.*, 1993).

Diferentes sistemas isoenzimáticos han sido usados para determinar variabilidad genética entre y dentro de poblaciones, tales como frejol (Paredes y Gepts, 1995), lenteja (Rodríguez, 1996), y en la identificación de cultivares de frejol (Bassiri y Adams, 1978). Esta técnica presenta diversas ventajas tales como la rapidez en la obtención de los resultados (Andersen y Fairbanks, 1990); el uso de poco material vegetal; una alta versatilidad en el tipo de tejido utilizado: semillas, hojas, tallos, frutos; su relativo bajo costo y su herencia codominante (Paredes y Gepts, 1995). Una de las principales desventajas que presenta la técnica es el número limitado de *loci* o alelos que pueden ser detectados, por lo que la discriminación genotípica es muy baja.

Los avances en estudios moleculares han ido incorporando con mayor frecuencia estas técnicas en estudios evolutivos, de variabilidad genética y construcción de mapas genéticos (Gepts, 1990), determinación del tamaño del genoma e identificación de genotipos (Beyermann *et al.*, 1992).

Dentro de las técnicas moleculares, los RAPDs basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han sido los más utilizados. Una de las razones que explican la alta aceptación de esta tecnología es su adecuada sensibilidad al determinar variabilidad genotípica dentro de ciertas especies (Beyermann *et al.*, 1992; Caetano-Anollés *et al.*, 1992) y un bajo costo de operación en comparación con otras técnicas moleculares (Andersen y Fairbanks, 1990). Esta técnica es relativamente simple y consiste en la amplificación de ADN al azar (Williams *et al.*, 1990), mediante el uso de partidores aleatorios (Welsh y McClelland, 1990; Caetano-Anollés *et al.*, 1992). Sin embargo, los RAPDs no han sido utilizados ampliamente en estudios de diversidad en frejol (Johns *et al.*, 1997).

En la identificación de individuos y variedades, los marcadores bioquímicos y moleculares pueden jugar un papel muy importante, ya que es posible determinar patrones específicos, los que corresponden a su identificación genética o 'fingerprinting'. Uno de los usos de la identificación de variedades es la protección para su uso comercial. El fingerprinting mediante RAPDs ha sido utilizado en varias especies leguminosas tales como lentejas (*Lens culinaris*) (Abo-elwafa *et al.*, 1995), garbanzos (*Cicer arietinum*) (Weising *et al.*, 1992; Kahl, 1997).

Los objetivos de este estudio fueron: caracterizar e identificar genéticamente, si es posible, las principales clases comerciales, selecciones locales y variedades mejoradas de frejol pertenecientes a la raza Chile, por medio del uso de isoenzimas y RAPDs y comparar estos resultados con la caracterización morfológica existente de los genotipos seleccionados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

En este estudio se evaluaron 52 genotipos de frejol pertenecientes a la raza Chile, de los cuales se incluyeron 19 genotipos endémicos pertenecientes a la clase comercial Tórtola, Coscorrón, Suaves y Manteca, y 26 materiales naturalizados incluidos en las clases comerciales Sapito, Frutilla, Cuyano, Pajarito o Cranberry, y Blanco. Además, se analizaron siete variedades mejoradas (Tórtola INIA, Torcaza INIA, Coscorrón Granado INIA, Cimarrón, Cuyano INIA, Araucano INIA, Rayo INIA). Este material genético fue proporcionado por el Banco de Germoplasma del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional de Investigación (CRI) Quilamapu, Chillán.

La germinación de las semillas se realizó en una incubadora a 25 °C. Posteriormente, las semillas germinadas fueron sembradas en bolsas plásticas conteniendo una mezcla de suelo y arena en relación 2:1. Para el análisis isoenzimático se co-

sechó una porción de las hojas primarias y para el análisis molecular se recolectaron las hojas verdaderas, previo al período de floración.

### I. Caracterización morfológica

La información morfológica y agronómica de los genotipos fue proporcionada por el Proyecto de Recursos Genéticos del INIA y el Proyecto de Mejoramiento Genético de Frejol, CRI Quilamapu. Esta evaluación del germoplasma incluyó características tales como tamaño, forma y color de la bractéola, tamaño, tipo de ápice, curvatura, tipo de sección y presencia o ausencia de fibra en la vaina; días a floración y madurez fisiológica, distancia al 5°-6° nudo; hábito de crecimiento; tamaño, forma, color y brillo del grano; color de la vaina al estado granado y peso de las 100 semillas. Esta evaluación se realizó en el Campo Experimental Santa Rosa del INIA-CRI Quilamapu, ubicado en Chillán (L. 34° 31' 34'' S; 71° 51' 40' W; 220 m.s.n.m).

### II. Caracterización bioquímica

Para este estudio se trabajó con geles de almidón al 10% y dos tipos de buffers: Histidina (0,065 M; pH 6,5) y Tris-Citrato-Litio-Borato (0,05M Tris pH 8,4; 0,03M hidróxido de litio; 0,19M ácido bórico pH 8,1). Se utilizó el protocolo sugerido por Paredes y Gepts (1995).

Los sistemas isoenzimáticos evaluados en este estudio fueron: Diaforasa (DIAP), Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (6PGD), Malato dehidrogenasa (MDH), Shikimato dehidrogenasa (SKDH), Aspartato amino transferasa (AAT), Fosfatasa ácida (AcPH), Fosfoglucomutasa (PGM), Glucosa fosfato isomerasa (GPI), Leucina amino peptidasa (LAP), Enzima málica (ME) y Peroxidasa (PER).

### III. Caracterización por amplificación del ADN al azar (RAPD)

El ADN genómico de cada accesión fue aislado a partir de hojas sanas y jóvenes almacenadas a

-75 °C, siguiendo el protocolo de Becerra y Gepts (1994). La concentración del ADN fue determinada mediante fluorometría, después de lo cual las muestras se diluyeron a 5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  (stock de RAPD).

Para este estudio se evaluaron 38 partidores de 10 mers (Operon Tech), pertenecientes a los sets A, D y E. La amplificación se realizó en un termociclador, Amplitron II, Termolyne con capa calefactora. La reacción de amplificación utilizada en este estudio fue la siguiente: 2  $\mu\text{L}$  dNTPs (200  $\mu\text{M}$ ); 1  $\mu\text{L}$  de partidor (5  $\mu\text{M}$ ); 2,5  $\mu\text{L}$  buffer de amplificación (10 X); 0,75  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (10 mM); 1  $\mu\text{L}$  de Tritón (X-100; 0,01%); 0,2  $\mu\text{L}$  de Taq Polimerasa (5  $\text{U}\mu\text{L}^{-1}$ ); 5  $\mu\text{L}$  de ADN (5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) y 12,25  $\mu\text{L}$  de agua estéril. Esta reacción de amplificación fue seleccionada por su consistencia y reproducibilidad.

La condición de amplificación fue la siguiente: a) 3 ciclos de 95 °C por 1 min, 37 °C por 1 min y 72 °C por 1,2 min y; b) 37 ciclos de 94 °C por 35 seg, 42 °C por 40 seg, 72 °C por 1 min; terminando con un período de extensión de 72 °C por 10 min y mantención a 4 °C.

Los productos de la reacción amplificada fueron separados en geles de agarosa (1,5%; 1 X TAE) aplicando 150 Volts y con un tiempo de corrida de 3 h. Los geles fueron teñidos con Bromuro de etidio, lo que permitió la visualización de las bandas bajo luz ultravioleta. Posteriormente los geles fueron fotografiados para su evaluación.

### IV. Análisis de los datos obtenidos

**Isoenzimas.** Luego de la tinción de los sistemas isoenzimáticos, se midió la distancia de migración de las bandas de cada accesión, desde el origen, lo cual generó diferentes zimogramas, determinándose el grado de polimorfismo y número de patrones de bandas para cada uno de los sistemas estudiados.

**RAPD.** Las bandas obtenidas en el proceso de amplificación fueron analizadas en forma bina-

ria por presencia (1) o ausencia (0). Esta información fue utilizada para obtener las distancias genéticas de Nei entre los genotipos analizados. Para este análisis se utilizó el Numerical Taxonomy and Multivariate System (NTSYS) (Rohlf, 1990).

Para identificar posibles patrones únicos que permitieran distinguir selecciones locales y variedades mejoradas dentro y entre las clases comerciales se analizaron los patrones obtenidos con los 38 partidores.

## RESULTADOS

### I. Identificación genotípica mediante isoenzimas

La evaluación de las isoenzimas se basó en la observación de los alelos presentes en los genotipos analizados. En líneas generales, se observó un bajo nivel de polimorfismo para la mayoría de los sistemas analizados.

#### A. Identificación de clases comerciales, selecciones locales y variedades mejoradas

A pesar que cada clase comercial de frejol es fácilmente identificable por su color de semillas, no fue posible identificar patrones isoenzimáticos específicos que caractericen las clases comerciales.

El análisis de los patrones isoenzimáticos indicó que las clases comerciales de los frejoles endémicos presentaron un menor nivel de polimorfismo que los frejoles naturalizados. Por ejemplo, los frejoles endémicos Tórtola y Suaves, presentaron sólo un sistema polimórfico (DIAP) y los tipo Coscorrón dos (DIAP, PER). En cambio, los frejoles naturalizados Bayo presentaron tres sistemas polimórficos (DIAP, SKDH y AAT) y en los tipo Blanco y Cuyano se detectaron dos (SKDH y DIAP). Finalmente, la excepción la presentaron los frejoles tipo Manteca (endémico) y Sapito (naturalizado) los que fueron monomórficos en los sistemas analizados.

### B. Identificación de las variedades comerciales

Los diferentes sistemas utilizados discriminaron parcialmente algunas de las variedades analizadas. Por ejemplo, el sistema PER (anodal) diferenció la variedad Araucano INIA de Rayo-INIA, pertenecientes a la misma clase comercial. En el caso de las variedades tipo Coscorrón, los sistemas DIAP y PER anodal distinguieron entre las variedades Cimarrón y Coscorrón Granado INIA (Cuadro 1).

## II. Identificación genotípica mediante RAPDs

Para el análisis molecular de las accesiones de frejol se utilizó un total de 38 partidores de 10 mers, pertenecientes a los grupos OPERON A, D, y E. Con estos partidores se obtuvo un total de 286 bandas, de las cuales 238 bandas (83,2%) fueron polimórficas y 48 (16,8%) monomórficas. Los partidores que presentaron un mayor número de bandas fueron, OPD-5, OPE-3 y OPE-4, los que presentaron 13 bandas, mientras que los partidores con menor número de bandas fueron el OPD-2, OPE-5 y OPE-8 con sólo 2 bandas. De los partidores analizados, el que presentó un mayor número de patrones fue el OPE-4 con un total de 11, y los partidores con menor número observados fueron los OPD-2, OPD-14, OPE-2, OPE-5 y OPE-8, con sólo 2 patrones. Dentro de los 38 partidores utilizados en el estudio, no se encontraron patrones específicos para las clases comerciales. Sin embargo, los partidores fueron capaces de detectar entre un 66% y 92% de polimorfismo entre las clases comerciales (Foto 1).

#### A. Identificación de las selecciones locales y clases comerciales

El análisis de las distancias genéticas (porcentaje de similitud) determinó la presencia de dos grandes grupos de accesiones (Figura 1) sin hacer una separación de las clases comerciales. El primero de ellos incluyó a las selecciones que presentaron sobre un 92% de similitud. El se-

**Cuadro 1. Patrones isoenzimáticos presentes en las diferentes variedades comerciales de frejol pertenecientes a la Raza Chile**

**Table 1. Isozyme patterns for commercial varieties of common beans belonging to the Chilean strain**

Variedades mejoradas	Histidina/patrón				Litio/patrón							
	SKDH	6PGD	MDH	DIAP	ME	AAT	LAP	ACPH	GPI	PGM	PERcat <sup>1</sup>	PERan <sup>1</sup>
Araucano INIA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Rayo INIA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cimarrón	H	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
Coscorrón G INIA	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	2
Cuyano INIA	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	2
Torcaza INIA	H	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Tórtola INIA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2

<sup>1</sup>cat: catodal; an: anodal.

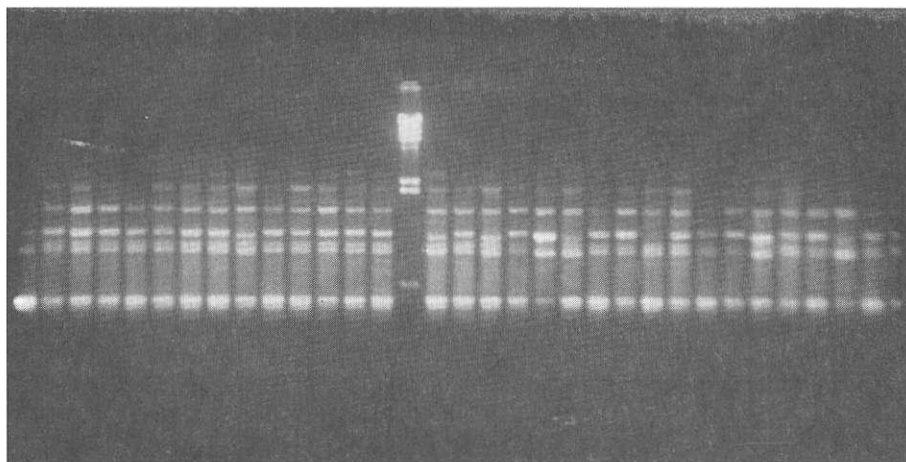


Foto 1. Amplificación de productos de ADN para diferentes genotipos de frejol pertenecientes a la raza Chile y generados por RAPD usando el "primer" Operon OPA-1. Línea 15 marcador estándar ADN Lambda digerido con *Hind* III.

Photo 1. Enlargement of DNA products for different bean genotypes belonging to the Chilean strain and generated by RAPD using the "primer" Operon OPA-1. Line 15 standard marker DNA Lambda assimilated with *Hind* III.

gundo ubicó una sola accesión (Cuyano 442), la cual presentó una similitud del 88%. Dentro del primer grupo fue posible distinguir 2 subgrupos, el primero de ellos agrupó los genotipos que presentaron una similitud superior al 96%, y el segundo incluyó genotipos con similitudes que variaron entre 96 y 92% (Cuadro 2, Figura 1).

Al analizar dentro de cada clase comercial se apreció un alto grado de similitud entre las selecciones locales, llegando en algunos casos a un 100% de similitud a nivel de RAPDs (Cuadros 3 y 4).

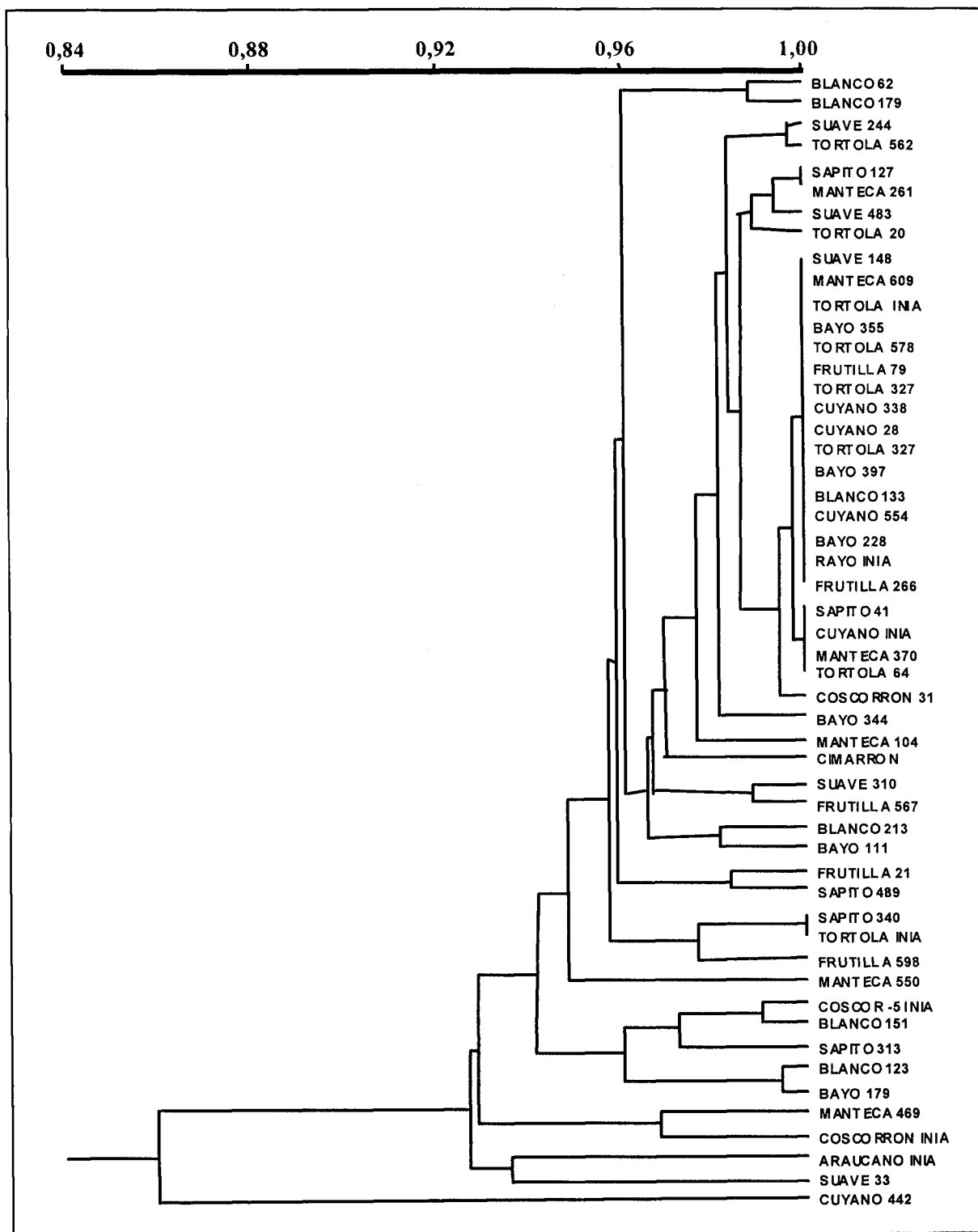


Figura 1. Dendrograma de diversidad genética de 52 genotipos de frejol raza Chile.  
 Figure 1. Dendrogram of genetic diversity of 52 genotypes of Chilean bean strains.

## B. Identificación de las variedades comerciales

Los partidores utilizados permitieron realizar un "fingerprinting" de las variedades mejoradas pertenecientes a una misma clase comercial. Es así como las variedades tipo Frutilla (Rayo INIA y Araucano INIA) fueron discriminadas utilizando 20 partidores, las variedades tipo Coscorrón (Cimarrón y Coscorrón Granado INIA) por medio de 16 partidores, y las variedades Tipo Tórtola (Torcaza INIA y Tórtola INIA) con 17 partidores (Cuadro 5).

**Cuadro 2. Similitud promedio (%) dentro de cada clase comercial de frejol chileno**

**Table 2. Average of similarity (%) within commercial classes of Chilean common beans**

Clase comercial	Similitud	Rango
Bayo	96	92-100
Blanco	96	91-99
Coscorrón	95	90-98
Cuyano	95	86-100
Frutilla	96	91-100
Manteca	97	93-100
Sapito	95	90-99
Suave	96	92-99
Tórtola	98	95-100
Promedio	96	

## III. Identificación fenotípica

El germoplasma analizado presentó polimorfismo en todas las características morfológicas y agronómicas evaluadas, dentro y entre las clases comerciales. En este caso hay que considerar que muchas de las características evaluadas son de carácter cuantitativo y de herencia compleja por lo que presentan una fuerte interacción genotipo-ambiente. Al analizar los datos morfológicos y agronómicos se observó que la única característica común que discriminó las clases comerciales fue el color de la semilla.

## DISCUSIÓN

Para especies con un alto porcentaje de autopolinización y/o especies con una estrecha base genética, como el frejol chileno, es difícil encontrar marcadores, partidores o sondas que puedan ser utilizados eficientemente en la determinación de la diversidad genética e identificación de genotipos. En estos casos, es necesario contar con una gran cantidad de información que pueda describir el germoplasma, tanto a nivel fenotípico como genotípico. De esta manera se genera una mayor cobertura del genoma.

En este estudio se utilizó un total de 320 características, de las cuales 34 fueron bioquímicas y 286 moleculares. Esta información se complementó con 22 características morfológicas y

**Cuadro 3. Similitud (%) dentro de la clase comercial Tórtola en base a RAPDs**

**Table 3. Similarity (%) within the commercial class Tórtola based on RAPDs**

Genotipos	1	2	3	4	5	6	7	8
Tórtola 20	100							
Tórtola 64	98	100						
Tórtola 327	99	100	100					
Tórtola 341	98	100	100	100				
Tórtola 562	96	99	98	98	100			
Tórtola 578	98	100	100	100	98	100		
Torcaza INIA	96	97	97	97	95	97	100	
Tórtola INIA	98	100	100	100	98	100	97	100



**Cuadro 4. Similitud (%) dentro de la clase comercial Coscorrón en base a RAPDs****Table 4. Similarity (%) within the commercial class Coscorrón based on RAPDs**

Genotipos	1	2	3	4
Coscorrón 31	100			
Coscorrón 470	95	100		
Coscorrón Granado INIA	98	90	100	
Cimarrón	97	95	95	100

agronómicas incluidas en el Proyecto de Recursos Genéticos del INIA. Al comparar el aporte cuantitativo de cada marcador podemos indicar que los RAPDs proporcionaron un 83,9% de la información analizada.

El estudio de las evaluaciones morfológicas y agronómicas de las accesiones indicaron diferencias fenotípicas entre los genotipos de la raza Chile, sin embargo, los valores de algunas de estas características son inestables ya que poseen una baja heredabilidad y son altamente influenciadas por el medio ambiente.

El bajo nivel de polimorfismo isoenzimático observado en este estudio estuvo dentro de los márgenes esperados, lo que impidió una discriminación clara y precisa de algunas de las clases comerciales y selecciones locales evaluadas. Sin embargo, algunos sistemas podrían ser utilizados para identificar en forma preliminar algunas variedades comerciales. Estos resultados confirman que esta técnica por sí sola no es suficiente para realizar una caracterización genética exhaustiva del germoplasma de frejol chileno. A pesar de esta limitación, esta tecnología ha sido extensamente utilizada en la caracterización e identificación de germoplasma en diversas especies y variedades tales como lenteja (Rodríguez, 1996) y frejol (Bassiri y Adams, 1978).

Los resultados observados al usar los RAPDs mostraron un mayor grado de polimorfismo

comparado con las isoenzimas, lo que confirma que esta técnica es más adecuada para estimar la variación intraespecífica en frejol. Esta situación se ha observado en otras especies con autopollinización, como en varias especies de lentejas (*Lens spp.*) (Abo-elwafa *et al.*, 1995).

La identificación de genotipos mediante RAPDs ha sido posible en varias especies debido a que cada selección o cultivar produce un patrón reproducible de bandas de ADN amplificado. La identificación de las clases comerciales y/o genotipos de frejol mediante este tipo de marcador fue posible comparando dos genotipos y considerando varios partidores. Esta tecnología también podría ayudar a la discriminación entre variedades mejoradas pertenecientes a la misma clase comercial de frejol. Por ejemplo, la separación entre las variedades tipo Coscorrón (Coscorrón Granado INIA y Cimarrón), tipo Frutilla (Rayo INIA y Araucano INIA) y Tórtola (Tórtola INIA y Torcaza INIA). Estos resultados concuerdan con trabajos anteriores en lentejas (Abo-elwafa *et al.*, 1995).

Los RAPDs poseen algunas desventajas, siendo la principal la influencia de algunos componentes y condiciones de reacción que afectan, en ciertos casos, la reproducibilidad de los resultados entre laboratorios (Weising *et al.*, 1992). Esta situación podría afectar el uso de este marcador en el proceso de protección de variedades.

El análisis de RAPDs permitió construir un dendrograma que muestra las relaciones intraespecíficas de los genotipos endémicos de Chile, como son Coscorrón, Tórtola, Suaves y Mantecas, y la relación con otras clases comerciales naturalizadas en Chile, como son Sapositos, Blancos, y Bayos.

El análisis del dendrograma no agrupó a los genotipos de acuerdo a su clase comercial, lo que podría indicar que cada clase comercial no posee suficientes alelos específicos que puedan determinar una constitución genética diferente. Al parecer, el color de la semilla es la única ca-

Cuadro 5. Partidores utilizados en el fingerprinting de variedades comerciales de frejol chileno

Table 5. Primers used for fingerprinting commercial varieties of Chilean beans

Partidor/ Patrón	Accesión						
	Araucano INIA	Rayo INIA	Cimarrón	Coscorrón G INIA	Cuyano INIA	Torcaza INIA	Tórtola INIA
A1	1	4	1	1	1	1	1
A2	2	1	2	2	2	1	2
A4	3	1	2	0	2	2	2
A5	2	2	4	2	2	2	2
A6	2	2	4	2	2	2	2
A7	2	4	2	2	3	2	3
A10	2	2	2	2	2	2	2
A13	2	2	2	2	2	1	2
D1	2	2	1	1	2	2	2
D2	1	1	1	1	1	1	1
D3	3	2	3	1	3	5	5
D4	2	2	2	2	3	2	2
D5	7	2	3	2	5	5	2
D6	0	1	1	1	3	1	1
D7	3	4	7	4	6	3	3
D8	3	5	3	2	2	2	2
D11	5	1	1	1	1	4	4
D12	2	5	1	4	1	0	1
D13	5	1	3	2	1	3	5
D14	0	2	0	2	2	0	2
D15	0	2	2	3	2	2	3
D16	0	1	2	1	1	3	1
D18	2	2	2	2	4	2	2
D20	2	3	3	2	8	3	2
E1	1	1	1	2	1	1	1
E2	2	2	2	2	2	2	2
E3	6	4	3	3	4	1	4
E4	2	6	7	2	10	2	4
E5	1	1	2	1	0	2	1
E8	1	1	1	1	1	1	1
E11	6	4	5	3	2	1	2
E14	3	3	1	1	2	3	2
E15	2	1	1	1	1	1	1
E16	7	5	1	4	1	1	4
E17	1	3	1	1	1	1	1
E18	3	1	0	1	1	4	1
E19	0	2	2	2	2	2	3
E20	4	2	1	1	1	4	1

racterística morfológica que permite la diferenciación entre ellas. Esta situación es apoyada por el hecho que el promedio de similitud entre y dentro de las clases comerciales es alta. Por ejemplo, la clase comercial Tórtola posee el mayor promedio de similitud (98%) comparado con el Tipo Cuyano, Coscorrón y Sapito, que sólo poseen un 95%.

Al comparar las características moleculares con las morfológicas y agronómicas se pudo apreciar que Tórtola 64 y Tórtola 341, presentaron un 100% de similitud mediante RAPD (Cuadro 3), sin embargo morfológicamente Tórtola 64 posee sólo un mayor tamaño de hoja. En el caso de Tórtola 64 y Tórtola 327, estos genotipos presentaron un 100% de similitud a nivel molecular (Cuadro 3), y la última selección posee un grano opaco a diferencia de Tórtola 64 que presenta grano brillante. Desde el punto de vista molecular, Tórtola INIA es igual a Tórtola 64, Tórtola 341 y Tórtola 578 (Cuadro 3), pero agronómicamente Tórtola INIA presenta una mayor precocidad. Por otro lado, Coscorrón 31 y Coscorrón 470 presentaron un 95% de similitud a nivel molecular (Cuadro 4), sin embargo, morfológicamente difieren en el grado de brillo de sus granos. Agronómicamente, Coscorrón Granado INIA presenta mayor precocidad que Coscorrón 31, siendo su porcentaje de similitud a nivel de RAPDs de 98% (Cuadro 4).

Estos promedios de similitud indican la presencia de una reducida variabilidad molecular a nivel de RAPDs. El hecho que el grado de variabilidad sea bajo hace que esta especie sea susceptible a vulnerabilidad, ganancia genética limitada, pérdida de variedades locales y problemas de conservación de la especie.

Esta situación se contrapone con la mayor diversidad en características morfológicas y agronómicas observadas entre estos materiales. Esto se debe a la presión de selección artificial a que han sido sometidos. Por otro lado los marcadores bioquímicos y moleculares no tienen un efecto directo sobre el fenotipo de la planta, por lo cual

no son afectados directamente por el proceso de selección.

Aun cuando las técnicas moleculares han sido extremadamente útiles en la caracterización e identificación del germoplasma, esta tecnología debe usarse como complemento a las evaluaciones morfológicas y agronómicas del material en estudio.

Cabe señalar que el bajo nivel de polimorfismo detectado en el frejol chileno es debido primariamente a su sistema reproductivo, es decir, a la escasa posibilidad de cruzarse libremente en la naturaleza, y en segundo lugar, al proceso de domesticación, donde se han producido "cuellos de botella" y una fuerte presión de selección para algunas características morfológicas, tales como hábito de crecimiento, precocidad, tamaño, forma y color de semilla. Una manera de cambiar esta situación con fines de mejoramiento, podría ser mediante cruzamientos entre genotipos de los dos pool de genes. Esta estrategia podría en parte aumentar y mejorar ciertas características productivas. Sin embargo, este proceso de recombinación genética no es fácil de realizar ya que se han detectado diferentes grados de incompatibilidad en el material segregante (Paredes, 1995).

Recientemente se está implementando una nueva estrategia que consiste en la utilización de frejol silvestre como padres mejorantes de las variedades cultivadas. En este proceso el uso de los mapas genéticos y marcadores moleculares podrían tener una amplia aplicación en la eliminación de genes indeseables, de bajo interés agronómico, tales como hábito de crecimiento, tamaño, color y forma de semilla y precocidad (Gepts *et al.*, 1993). Otras aplicaciones de estos resultados en los programas de mejoramiento y conservación de recursos genéticos, está en la organización del germoplasma, detección de material duplicado, identificación de grupos que presenten una buena habilidad combinatoria general y/o específica, y en la selección de padres mejorantes.