UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

"Análisis de la variabilidad genética en poblaciones primitivas y silvestres de *Phaseolus vulgaris*, mediante marcadores bioquímicos y moleculares"

Tesis presentada para optar al grado de Doctora en Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata

Lic. Marta Zulema Galván

Director de tesis: Dr. Pedro A. Balatti.
Codirectora de tesis: Dra. Analía A. Lanteri

Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE)
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Universidad Nacional de La Plata.

-La Plata, Buenos Aires, 2006-

A mis padres Elsa y Miguel,

y a mis hermanos Miguel,

María del Carmen

y Natalia.

AGRADECIMIENTOS

A la Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) y a la Universidad Nacional de La Plata, por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación.

Al Dr. Pedro A Balatti, por brindarme la posibilidad de formarme bajo su dirección, contando con su apoyo, confianza y constante estímulo en mi trabajo.

A la Dra. Analía Lanteri por brindarme su orientación, su valiosa ayuda en el análisis de los resultados y por su constante preocupación para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. María del Carmen Menéndez Sevillano por facilitarme el material y los datos de recolección para la realización de esta tesis.

A Sebastián, Geraldine y Guillermina por su amistad, por bancarme y compartir conmigo esta etapa, por alentarme siempre y hacer del día a día una aventura.

A cada uno de mis compañeros de laboratorio por demostrarme en todo momento su apoyo, cordialidad y afecto en las jornadas de trabajo compartidas en el INFIVE.

A mis compañeros y egresados de la Licenciatura en Genética por estar siempre en contacto y por su ayuda incondicional a través de la lista web “licengen”, especialmente a Andrés por ayudarme con los programas de análisis de datos.

A mis amigos de Salta por el afecto y el recuerdo mantenido a través de los años.

A mi familia por su cariño y apoyo incondicional a mis proyectos y por estar siempre junto a mí.

A todos aquellos, que de alguna manera u otra, colaboraron para que este trabajo fuera posible.

A todos, ¡Muchas Gracias!

Índice General

	Pág.
Resumen	**i**
Abstract	**v**
Índice de Figuras	viii
Índice de Tablas	x

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Biodiversidad	2
Biodiversidad agrícola y seguridad alimentaria	4
Importancia económica del poroto común	6
Centros de domesticación de las especies cultivadas	7
Ubicación Taxonómica y características generales de *Phaseolus vulgaris*	9
Acervos génicos de *Phaseolus vulgaris*	12
Origen y centros de diversidad de *Phaseolus vulgaris*	14
Domesticación del poroto común	17
Características de los porotos domesticados	21
Análisis de la variabilidad genética	23
Empleo de marcadores moleculares en el estudio de la variabilidad genética de *Phaseolus vulgaris*	32
Antecedentes del cultivo de *P. vulgaris* en la Argentina	39
OBJETIVOS	**43**

CAPÍTULO 2: Análisis de la variabilidad genética de poblaciones silvestres de *Phaseolus vulgaris*

INTRODUCCIÓN	**45**
Sistema reproductivo	47
Análisis de la variabilidad genética	49
MATERIALES Y MÉTODOS	**53**
Material biológico	53
Marcadores bioquímicos. Faseolinas	57
Marcadores moleculares	59
Análisis de datos	64

RESULTADOS 69
Marcadores bioquímicos. Faseolinas 69
Marcadores moleculares 72
Marcadores RAPD 72
Marcadores ISSR 83
DISCUSIÓN 95
CONCLUSIONES 103

CAPÍTULO 3: Análisis de la variabilidad genética de poblaciones primitivas de *Phaseolus vulgaris*

INTRODUCCIÓN 106
Variabilidad genética en los porotos primitivos 108
MATERIALES Y MÉTODOS 114
Material biológico 114
RESULTADOS 118
Marcadores bioquímicos. Faseolinas 118
Marcadores moleculares 121
Marcadores RAPD 121
Marcadores ISSR 130
DISCUSIÓN 141
CONCLUSIONES 147

CAPÍTULO 4: Análisis de la variabilidad genética entre poblaciones silvestres y primitivas de *Phaseolus vulgaris*

INTRODUCCIÓN 150
MATERIALES Y MÉTODOS 154
Material biológico 154
Análisis de marcadores moleculares 154
RESULTADOS 157
Bandas polimórficas 157
Análisis de agrupamientos y Análisis de Coordenadas Principales 157
Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) 162

DISCUSIÓN 164
CONCLUSIONES 171

CAPÍTULO 5: Anexos

Anexo 1 Importancia económica del poroto común 174
Anexo 2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) 177
Anexo 3 Faseolina 180
Anexo 4 Condiciones ambientales del Noroeste Argentino 181

CAPÍTULO 6: Bibliografía 186

Resumen

El poroto común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa originaria de América y representa un componente importante en la dieta de la población latinoamericana por su alto contenido en proteínas y carbohidratos.

El poroto cultivado se originó de los porotos silvestres, que son plantas anuales, herbáceas y trepadoras, que se distribuyen desde el norte de México hasta el noroeste de la Argentina. Estudios basados en caracteres morfológicos, bioquímicos y moleculares revelaron que tanto dentro de las variedades cultivadas como de las silvestres existen dos acervos génicos principales, uno Andino y el otro Mesoamericano. Las provincias del Noroeste Argentino (NOA) albergan un gran número de porotos silvestres y de variedades locales tradicionales (primitivas o "landraces") mantenidas durante años en un sistema de cultivo tradicional. Sin embargo muchas de estas poblaciones están en peligro de extinción debido a las presiones de explotación forestal y pastoreo existentes en la zona, por lo que resulta de fundamental importancia su recolección y estudio.

En esta tesis se analizó la variabilidad genética de un grupo de poblaciones silvestres y primitivas de poroto común del NOA, recolectadas en diferentes sitios de las provincias fitogeográficas de las Yungas, Prepuna y del Chaco, entre los 1300 y 2900 msnm, utilizando marcadores bioquímicos (proteínas de reserva de las semillas: faseolinas) y moleculares (RAPD e ISSR).

Se trabajó con un total de 27 individuos de distintas muestras poblacionales de porotos silvestres (*Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus*) y 30 individuos pertenecientes a muestras poblacionales de porotos primitivos (*Phaseolus vulgaris* L.) depositadas en la colección del Banco de germoplasma del Laboratorio de

Recursos Fitogenéticos “N. I. Vavilov” de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

Se obtuvieron patrones de faseolinas y de bandas RAPD e ISSR, a partir de 34 “primers” y 10 ”primers”, respectivamente. Los datos de presencia/ausencia de bandas RAPD e ISSR se volcaron en matrices de datos que se analizaron mediante técnicas de agrupamientos (UPGMA y Neighbor Joining) y de ordenación (Análisis de Coordenadas Principales), realizándose además un análisis de la varianza molecular (AMOVA). Las muestras de porotos silvestres se analizaron independientemente (Capítulo Dos) de las muestras de porotos primitivos (Capítulo Tres) y posteriormente en forma conjunta (Capítulo Cuatro), con el objetivo de analizar la similitud genética existente entre ambos tipos de poblaciones y detectar la presencia de formas intermedias, las cuales podrían ser el resultado de cruzamientos ocasionales entre poblaciones simpátricas.

Los tres marcadores empleados (faseolinas, RAPD e ISSR) permitieron analizar diferentes aspectos que hacen a la diversidad de las muestras. Mientras que la electroforesis de proteínas de reserva permitió establecer el acervo génico de los materiales estudiados, los marcadores RAPD e ISSR contribuyeron a detectar diferencias a niveles más bajos (variación interpoblacional, intrapoblacional o individual). Los marcadores ISSR demostraron ser muy eficientes en la separación de porotos silvestres y domesticados, permitieron distinguir muestras procedentes de diferentes provincias del NOA y sitios geográficos, contribuyeron a identificar polimorfismos dentro de ellas y a reconocer individuos que por sus características intermedias podrían ser resultado del cruzamientos entre poblaciones silvestres y primitivas.

El análisis de marcadores proteicos produjo dos patrones diferentes de faseolinas (T y J) los cuales son característicos del acervo génico Andino. Los ISSR

demostraron ser más eficientes que los RAPD para agrupar individuos según su provincia de origen y para caracterizar a dichos individuos, probablemente debido a la naturaleza de las secuencias amplificadas. El mayor número de bandas polimórficas amplificadas por los “primers” ISSR permitió generar haplotipos únicos para los distintos individuos. Con la técnica de ISSR se identificó un 36% y un 27% de bandas polimórficas para los porotos silvestres y primitivos, respectivamente, mientras que con los RAPD el porcentaje de bandas polimórficas observado fue menor (porotos silvestres: 15%, porotos primitivos: 16%).

Los análisis moleculares pusieron en evidencia que el patrón de distribución de la variabilidad genética de las muestras silvestres se asocia con la distribución geográfica de las mismas. Se observó una correlación significativa entre las matrices de similitud obtenidas a partir de los marcadores moleculares, las diferencias de altura entre los sitios de recolección de las muestras poblacionales y las distancias geográficas existentes entre los sitios. La mayoría de los individuos de Jujuy y Tucumán formaron grupos genéticamente más similares entre sí que con los de Salta, información que concuerda con los obtenidos a partir de caracteres morfoagronómicos. Las muestras de Jujuy y Tucumán provienen de sitios localizados entre 1300 y 1800 msnm, y 23 y 27º de latitud Sur; los de Salta, en cambio, proceden de sitios localizados entre 2300 y 2500 msnm, a 22º 15` de latitud Sur y están más aislados geográficamente. El aislamiento geográfico favorecido por la topografía del NOA habría conducido al mantenimiento de genotipos y morfologías distintivas de cada ecoregión, y cierto grado de fecundación cruzada sumada al flujo génico entre poblaciones cercanas habría mantenido la variabilidad intrapoblacional observada, en los porotos silvestres.

El patrón de variabilidad genética de los porotos primitivos no presenta relación con su distribución geográfica. La mayoría de los porotos primitivos se

asocia por muestra o número de entrada, siendo dichas muestras representativas de distintos tipos de porotos cultivados en la zona, que se diferencian principalmente por el tamaño y el color del tegumento de la semilla. Se observó una elevada variabilidad genética dentro de las localidades o sitios muestreados, con una baja diferenciación entre localidades, lo que podría deberse a una selección homogénea ejercida por los productores en los distintos ambientes y al frecuente intercambio de semillas entre los agricultores del área

Los resultados aquí obtenidos sugieren que en el NOA las condiciones ecológicas y la intervención del hombre estarían favoreciendo el flujo de genes desde las poblaciones de porotos silvestres hacia los domesticados, dando lugar a un incremento de la variabilidad genética en algunas poblaciones primitivas y generando complejos intermedios (“wild-weedy-cultivated”) como resultado de los cruzamientos. Estos complejos serian de gran interés para el mejoramiento de los cultivares comerciales.

Abstract

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a Legume native from America, and a major component of the diet of Latin-American populations, due to its great protein and carbohydrates content.

Cultivated common beans derived from wild ancestors, which are herbaceous climbing annual plants, that are distributed from northern Mexico to northwestern Argentina. Based on morphological, biochemical and molecular evidences two major gene pools have been described for wild and cultivated beans. One in Mesoamerica and another one from the eastern side of the Andes in South America.

The environment of Northwestern Argentina (NOA) allows the development of a great number of wild beans and primitive or unimproved landraces, which have been grown for years under traditional culture systems. It is particularly important to collect and study these populations of common beans since they are endangered due to the destruction of their habitats by forest exploitation and agricultural practices.

In this thesis the genetic variability of landraces and wild populations of common bean form Northwestern Argentina (NOA) were analyzed by means of biochemical markers (seed storage proteins: phaseolin) and molecular markers (RAPD and ISSR). Samples were collected in different sites in the Yungas, Prepuna and Chaco phytogeographic provinces, between 1300 and 2900 masl.

Twenty seven individuals from different population samples of wild beans (*Phaseolus vulgaris* var *aborigineus*) and 30 individuals from samples of common bean landraces (*Phaseolus vulgaris* L.) were herein studied. The accessions were obtained from the collection of the “N. I. Vavilov” Germplasm Bank from the

"Laboratorio de Recursos Fitogenéticos N. I. Vavilov" of the "Facultad de Agronomía", "Universidad de Buenos Aires".

RAPD and ISSR bands were generated using 34 and 10 primers, respectively. The bands were recorded as present or absent and were assembled in data matrices, that were analyzed by means of cluster analysis (UPGMA and Neighbor Joining), and ordination techniques (Principal Coordinates Analysis). The analysis of the molecular variance (AMOVA) was also performed.

First, wild bean samples were analyzed independently (Chapter Two) from landraces (Chapter Three). Later, both kinds of samples were studied simultaneously (Chapter Four) to detect intermediate forms that might be the result of occasional crosses between sympatric populations.

The three types of markers (phaseolin, RAPD and ISSR) allowed to analyze different aspects of the populations' diversity. While the seed storage protein electrophoresis successfully identified populations based on the gene pool of origin, RAPD and ISSR markers contributed to detect differences at lower levels (inter-intrapopulation or individual variation). ISSR markers contribute to identify populations from different provinces and geographic location, to show intrapopulation variability and to detect intermediate forms that might derive from crosses between wild and cultivated beans.

Two phaseolin patterns (T and J) were characteristic for the Andean gene pool. The ISSR technique was more efficient than RAPD to characterize and cluster individuals by their province of origin, probably because of the nature of the sequences amplified in each case. The superior number of polymorphic bands amplified with the ISSR primers generated unique haplotypes for most individuals. ISSR technique allowed to identify 36% and 27% of polymorphic bands for wild beans and landraces, respectively. The percentage of polymorphic bands recorded with RAPDs was lower (wild beans: 15%, landraces: 16%).

The distribution pattern of genetic variability of the wild samples was associated with their geographic distribution. There was a significant correlation between the similarity matrices obtained from molecular markers, the differences in altitudes of sample sites and the geographic distances between sites. Most individuals from Jujuy and Tucumán were genetically more similar between each other than those individuals from Salta. These results are in agreement with the clusters recorded using morphoagronomic data. The population samples from Jujuy and Tucumán come from sites located between 1300 and 1800 masl, and 23º and 27º S latitude; on the other hand, the populations from Salta come from sites located between 2300 and 2500 masl, 22º 15` S latitude and are geographically more isolated. The isolation favored by the topography of the NOA might have conducted to the maintenance of distinct genotypes and morphologies typical of each ecoregion. At the same time, certain degree of outcrossing and gene flow between close populations might help to maintain variability observed in wild beans.

The pattern of genetic variability of landraces and their geographic distribution were unrelated. Most landraces clustered by sample or accession number, representing the different types of beans cultivated in the area, which can be differentiated by seed color and size. A great genetic variability was observed within each sample, but there was not a clear differentiation among sites. This might be due to a homogeneous selection exerted by the farmers in the sampled area and a frequent seed exchange among people in the local markets.

The results of this thesis suggest that the ecological conditions and human intervention in the NOA might be favoring the gene flow from wild to domesticated bean populations, increasing the genetic variability in some landraces and generating intermediate complexes (wild-weedy-cultivated) as a result of the outcrossings. These complexes would be of great interest for the commercial cultivars breeding programs.

Índice de Figuras

Capítulo 1

Pág.
1.1. Diversidad de especies identificadas hasta la actualidad 3
1.2. Centros de domesticación de cultivos 9
1.3. Tipos de hábitos de crecimiento observados en el poroto común 12
1.4. Diversidad observada en las semillas de poroto común *Phaseolus vulgaris* L. 13
1.5. Distribución de los restos arqueológicos de poroto común y edad de los sitios 15
1.6. Centros de diversificación primaria de *Phaseolus vulgaris* en América 16
1.7. Mapa de ligamiento (síndrome de domesticación) 20
1.8. Esquema del complejo wild-weedy-cultivated 34
1.9 Variedades de porotos comerciales del NOA 41

Capítulo 2

2.1. Flor de *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* 48
2.2. Sitios donde fueron recolectadas las muestras de porotos silvestres analizadas 53
2.3. Muestras de porotos silvestres analizadas 56
2.4. Vegetación de Tiraxi, una de las localidades de recolección de muestras 56
2.5. Curva de calibración del método de Bradford 58
2.6. Patrones de faseolina de las muestras de porotos silvestres estudiados 70
2.7. Amplificación de ADN genómico utilizando 12 “primers” RAPD 73
2.8. Amplificación de ADN de porotos silvestres utilizando el “primer” OPA02 73
2.9. Amplificación de ADN de porotos silvestres utilizando el “primer” OPG03 74
2.10. Amplificación de ADN de porotos silvestres utilizando el “primer” OPA09 74
2.11. Amplificación de ADN de porotos silvestres utilizando el “primer” OPA20 75
2.12. Fenograma de porotos silvestres mediante RAPD (SM) 78
2.13. Fenograma de porotos silvestres mediante RAPD (J) 78
2.14. Análisis de Coordenadas Principales de porotos silvestres mediante RAPD (SM) 80
2.15. Análisis de Coordenadas Principales de porotos silvestres mediante RAPD (J) 80
2.16. Árbol de Neighbor Joining de porotos silvestres mediante RAPD (J) 82
2.17. Amplificación de ADN de porotos silvestres utilizando diferentes “primers” ISSR 83
2.18. Amplificación de ADN de porotos silvestres utilizando el “primer” A 85
2.19. Amplificación de ADN de porotos silvestres utilizando el “primer” C 85
2.20. Amplificación de ADN de porotos silvestres utilizando el “primer” D 86
2.21. Amplificación de ADN de porotos silvestres utilizando el “primer” G 86
2.22. Fenograma de porotos silvestres mediante marcadores ISSR (SM) 89
2.23. Fenograma de porotos silvestres mediante marcadores ISSR (J) 89
2.24. Análisis de Coordenadas Principales de porotos silvestres mediante ISSR (SM) 91
2.25. Análisis de Coordenadas Principales de porotos silvestres mediante ISSR (J) 91
2.26. Árbol de Neighbor Joining de porotos silvestres mediante ISSR (J) 92
2.27. Fenograma de porotos silvestres empleando caracteres morfoagronómicos 100

Capítulo 3

3.1. Variabilidad observada en las poblaciones silvestres de poroto común 107
3.2. Cultivo de variedades primitivas de poroto común en la provincia de Salta 108
3.3. Sitios de recolección de las muestras de porotos primitivos estudiados 115
3.4. Muestras poblacionales de porotos primitivos 116
3.5. Patrones de faseolina de diez muestras de porotos primitivos 119
3.6. Amplificación de ADN de porotos primitivos y silvestres utilizando 5 “primers” RAPD 122
3.7. Amplificación de ADN de porotos primitivos utilizando el “primer” OPA02 122
3.8. Amplificación de ADN de porotos silvestres utilizando el “primer” OPA20 123
3.9. Amplificación de ADN de porotos silvestres utilizando el “primer” OPG03 123
3.10. Amplificación de ADN de porotos silvestres utilizando el “primer” OPB10 124
3.11. Fenograma de porotos primitivos mediante marcadores RAPD (SM) 126
3.12. Fenograma de porotos primitivos mediante marcadores RAPD (J) 126
3.13. Análisis de Coordenadas Principales de porotos primitivos mediante RAPD (SM) 128
3.14. Análisis de Coordenadas Principales de porotos primitivos mediante RAPD (J) 128
3.15. Árbol de Neighbor Joining de porotos primitivos mediante RAPD (J) 129
3.16. Amplificación de ADN de porotos primitivos utilizando el “primer” A 131
3.17. Amplificación de ADN de porotos primitivos utilizando el “primer” C 132
3.18. Amplificación de ADN de porotos primitivos utilizando el “primer” G 132
3.19. Amplificación de ADN de porotos primitivos utilizando el “primer” D 133
3.20. Fenograma de porotos primitivos mediante marcadores ISSR (SM) 136
3.21. Fenograma de porotos primitivos mediante marcadores ISSR (J) 136
3.22. Análisis de Coordenadas Principales de porotos primitivos mediante ISSR (SM) 137
3.23. Análisis de Coordenadas Principales de porotos primitivos mediante ISSR (J) 137
3.24. Árbol de Neighbor Joining de porotos primitivos mediante ISSR (J) 138
3.25. Fenograma de porotos primitivos empleando caracteres morfoagronómicos 143

Capítulo 4

4.1. Sitios de recolección de las muestras de porotos silvestres y primitivos estudiados 155
4.2. Fenograma de porotos silvestres y primitivos con marcadores ISSR 159
4.3. Análisis de Coordenadas Principales de porotos silvestres y primitivos 160
4.4. Árbol de Neighbor Joining de porotos silvestres y primitivos mediante ISSR (J) 161
4.5. Fenograma de porotos silvestres y primitivos empleando caracteres morfológicos 168

Capítulo 5. Anexo

5.1. Producción mundial y países productores de poroto 174
5.2. Principales países exportadores 175
5.3. Producción nacional de las principales provincias productoras de poroto 176
5.4. Reacción en cadena de la polimerasa 178
5.5. Amplificación de ADN por PCR 179
5.6. Precipitación y temperatura media anual del NOA 181
5.7-5.9. Análisis de Coordenadas Principales de los datos morfológicos 182/4

Índice de Tablas

Capítulo 1

Pág.

1.A. Exportación argentina por destino de poroto alubia y poroto negro 7

1.B. Especies que componen el género *Phaseolus* 11

1.C. Características de las variedades silvestres y razas cultivadas de *P. vulgaris* 18

1.D. Caracteres adaptativos y primitivos de *P. vulgaris* 22

1.E. Caracteres de las razas de porotos cultivados 23

1.F. Marcadores moleculares basados en PCR 31

1.G. Poblaciones mapeadas de poroto común y los caracteres identificados 37

Capítulo 2

2.A. Diferencias morfológicas entre *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* y *Phaseolus vulgaris* var. *mexicanus* 46

2.B. Tipos de faseolinas encontrados en los porotos silvestres y domesticados 50

2.C. Sitios de recolección de las muestras de porotos silvestres 54

2.D. Zonas fitogeográficas donde fueron recolectadas las muestras silvestres 55

2.E. Secuencias de los “primers” RAPD utilizados para el análisis de los porotos silvestres 61

2.F. Secuencia s de los “primers” ISSR utilizados para el análisis de las muestras silvestres 62

2.G. Tipos de faseolina observados en los porotos silvestres 69

2.H. Resultados de las reacciones de amplificación con “primers” RAPD 72

2.I. Matriz Básica de Datos de porotos silvestres aplicando la técnica de RAPD 76

2.J. Eigenvalores de las cuatro primeras coordenadas principales empleando RAPD 79

2.K. Productos de amplificación generados con cada “primer” ISSR polimórfico 83

2.L. Síntesis de las reacciones de amplificación de muestras silvestres mediante ISSR 84

2.M. Matriz Básica de Datos de porotos silvestres aplicando la técnica de ISSR 88

2.N. Eigenvalores de las cuatro primeras coordenadas principales empleando ISSR 90

2.O. Haplotipos obtenidos por población empleando los marcadores moleculares 93

2.P. Análisis de la varianza molecular existente en las muestras de porotos silvestres 94

2.Q. Caracteres morfoagronómicos de muestras silvestres del Noroeste Argentino 100

Capítulo 3

3.A. Sitios de recolección de las muestras de porotos primitivos estudiadas 115

3.B. Tipos de faseolina observados en las muestras de porotos primitivos 118

3.C. Productos de amplificación obtenidos con marcadores RAPD 121

3.D. Matriz Básica de Datos de porotos primitivos aplicando la técnica de RAPD 125

3.E. Eigenvalores de las cuatro primeras coordenadas principales empleando RAPD 127

3.F. Resultados de la amplificación para cada “primer” ISSR polimórfico 130

3.G. Productos de amplificación obtenidos mediante marcadores ISSR 130

3.H. Matriz Básica de Datos de porotos primitivos aplicando la técnica de ISSR 134

3.I. Eigenvalores de las cuatro primeras coordenadas principales empleando ISSR 135

3.J. Haplotipos obtenidos por población empleando los marcadores moleculares 139

3.K. Análisis de la varianza molecular existente en las muestras de porotos primitivos 140
3.L. Caracteres morfoagronómicos de muestras primitivas del Noroeste Argentino 143

Capítulo 4

4.A. Sitios de recolección de las muestras de porotos silvestres y primitivos 156
4.B. Secuencia de los “primers” usados para el análisis de las muestras silvestres y primitivas 157
4.C. Eigenvalores de las cuatro primeras coordenadas principales empleando ISSR 158
4.D. Haplotipos obtenidos por población empleando marcadores moleculares 163
4.E. Análisis de la varianza molecular existente en los porotos silvestres y primitivos 163
4.F. Caracteres morfoagronómicos de muestras de porotos silvestres y primitivos del NOA 168

Capítulo 5

5.A. Superficie y producción mundial de poroto 174
5.B. Eigenvectores del Análisis de Componentes Principales de la Figura 5.7. 183
5.C. Eigenvectores del Análisis de Componentes Principales de la Figura 5.8. 184
5.D. Eigenvectores del Análisis de Componentes Principales de la Figura 5.9. 185

CAPÍTULO 1

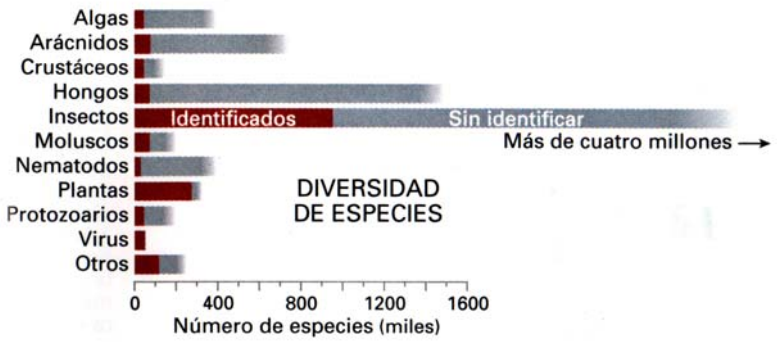
INTRODUCCIÓN

Biodiversidad

La diversidad biológica se puede definir como la variedad y variabilidad de los seres vivos y de los complejos ecológicos que ellos integran. La misma abarca los distintos ecosistemas, especies y genes y su abundancia relativa (Crisci *et al.,* 1993).

El número de especies biológicas que existen sobre el planeta no se conoce con exactitud, pero algunos autores estiman que no sería inferior a los 10 millones (Wilson, 1988). Desde mediados del siglo XVIII, cuando Linneo publicó su obra *Systema Naturae*, se han identificado entre 1,5 y 1,75 millones de especies, de las cuales unas 750 mil son insectos, 250 mil plantas vasculares y briófitas, y 45 mil vertebrados (Figura 1.1). Esto significa que resta aún descubrir y describir una gran cantidad de organismos, tarea que es imperioso realizar cuanto antes puesto que la extinción acelerada de especies está reduciendo la biodiversidad (Wilson, 1992). La destrucción y fragmentación de los habitats, la polución, el calentamiento global, la introducción de especies exóticas, la sobreexplotación de los recursos naturales y otros factores asociados con las actividades humanas han conducido a la aceleración de la tasa de extinción de especies, la cual en la actualidad probablemente sea 1000 a 10.000 veces superior a la registrada por causas naturales en tiempos geológicos previos al origen del hombre (Raven, 1987).

Figura 1.1. Diversidad de especies identificadas hasta la actualidad (Berry *et al*., 1999).



El valor de la diversidad biológica desde el punto de vista productivo es incalculable. Uno de los principales usos que hace el hombre de las especies animales y vegetales está relacionado con su alimentación. De las 300 mil especies vegetales descriptas solo entre 150 y 200 son empleadas como fuentes de alimentos (Shand, 1997). Algunas sólo se cultivan y consumen localmente, a veces por poblaciones aborígenes (Crisci *et al*., 1993). Muchas de las especies que son utilizadas para el consumo doméstico se conocen como variedades o razas locales o primitivas. Estas razas, como así también las plantas y animales silvestres, constituyen una fuente irreemplazable de variabilidad genética y pueden contribuir al mejoramiento de las variedades domesticadas a través de la introgresión de genes. La diversidad biológica no sólo puede constituir una fuente de beneficios directos al hombre (organismos como fuente de alimentación, medicinas, productos para vestimenta, construcción de viviendas, etc.) sino que además aporta otros beneficios ecológicos indirectos como son el reciclado de nutrientes, la oxigenación del aire, el control de la erosión de suelos, etc. (Crisci *et al*., 1993).

Biodiversidad agrícola y seguridad alimentaria

La biodiversidad agrícola incluye la diversidad de los individuos que contribuyen a la producción de alimentos y con ello a la nutrición del hombre (Shand, 1997). En la actualidad la biodiversidad agrícola se está perdiendo a una escala sin precedentes peligrando las bases biológicas para la seguridad alimentaria[1] mundial. Las estadísticas muestran que mientras los recursos genéticos de las plantas cultivadas están desapareciendo en una proporción del 1-2% anual, el ganado de cría doméstico lo hace a una tasa anual del 5% y las selvas tropicales al 1% por año o 29 hectáreas por minuto. Alrededor del 70% de las especies de peces están completamente sobreexplotadas, agotadas o en proceso de recuperación. El suelo, que también se degrada como resultado de la acción del hombre, se erosiona a una tasa entre 13 y 80 veces superior a la de su formación (Shand, 1997).

El hombre necesita utilizar los recursos naturales, pero es indispensable que lo haga racionalmente, porque del manejo correcto de los ecosistemas depende la calidad de vida presente y futura del hombre en la tierra (Mc Neely, 1988).

A pesar de la gran cantidad de recursos disponibles, el mundo carece de seguridad alimentaria ya que existen más de 800 millones de personas que están mal alimentadas (Reeves *et al.*, 1999). Se estima que en el año 2050 mas de 10 mil millones de personas habitarán el planeta (FAO, 1999), lo que generará un aumento de la demanda de alimentos que sólo se cubrirá triplicando la producción agrícola en los próximos 40 años. En el futuro, la fuente para incrementar la producción de alimentos deberá ser el resultado de mayores rendimientos y del aumento del área cultivada. El crecimiento en la producción de alimentos en las últimas décadas se ha debido principalmente a un incremento en los rendimientos. Por ejemplo, en

[1] Existe seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos, inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimentarias y sus preferencias en cuanto a los alimentos, a fin de llevar una vida activa y sana (FAO, 1999).

cereales el incremento del rendimiento ha sido la causa del aumento del 92% en la producción, mientras que la expansión del área de cultivo contribuyó sólo en un 8%. El mejoramiento genético de los cultivos es, entre otros, uno de los factores que ha contribuido al incremento de la producción agrícola. El desafío para los próximos años es aumentar la producción preservando el medio ambiente, es decir, en un marco de sustentabilidad (Shand, 1997). Para un desarrollo agropecuario sustentable, es fundamental disponer de programas de mejoramiento genético que generen, no sólo cultivares con resistencia a plagas y enfermedades, sino que además se adapten a condiciones ambientales adversas. Todo esto permitirá reducir sensiblemente la cantidad de agroquímicos a aplicar en los cultivos (Reeves *et al.*, 1999). La fuente esencial de recursos genéticos para la obtención de cultivares mejorados con características de resistencia a enfermedades, a la sequía, con mayor valor proteico, o con mayor plasticidad, es decir adaptados a un amplio espectro de condiciones ambientales, es la variabilidad existente en las especies silvestres y primitivas (FAO, 2002). Por ello, es de gran importancia el estudio y la caracterización genética de las especies. La biotecnología aporta nuevas y potentes herramientas para el estudio y caracterización de la variabilidad de las especies vegetales, conocimiento que eventualmente puede contribuir y ser de gran utilidad en los programas de mejoramiento de las plantas cultivadas (Grattapaglia y Ferreira, 1996). En este trabajo de tesis se propone analizar, empleando diferentes técnicas moleculares, la diversidad genética de poblaciones silvestres y primitivas de poroto común, *Phaseolus vulgaris* L. (Leguminosae, Phaseoleae) recolectados en la región del Noroeste Argentino, área propuesta como uno de los centros de diversificación de la especie. La caracterización y análisis de estos materiales serán un aporte importante para futuros programas de mejoramiento genético.

Importancia económica del poroto común

Situación mundial

En los últimos años la producción mundial de porotos secos fue de 16,4 a 17,5 millones de toneladas, que se obtuvieron a partir de una superficie cercana a las 24 millones de hectáreas (Ver Anexo 1, página 174). La producción mundial se encuentra diversificada en cada uno de los continentes. Asia, concentra el 50% de la producción mundial, siendo China el principal productor. En el continente Americano se genera el 40% de la producción mundial y se encuentra el 34% de la superficie sembrada. Entre los principales países productores se encuentran: Brasil, México, EE.UU. y Canadá. Argentina ocupa en la actualidad el quinto lugar y aporta el 1,9% de la producción (FAO, 2006).

Mercado Local

Entre un 3,5 y un 5,0 % de la producción de porotos secos del continente Americano se produce en la Argentina. Entre los distintos tipos de porotos se destacan el blanco y el negro, representando los otros tipos, por ejemplo carioca, colorados, cranberry, manteca, pallares, navy bean, etc, sólo el 8% de la producción. Si bien la producción de poroto blanco y negro varía de año a año, en función de la demanda externa y los precios, el poroto negro tiene una mayor importancia comercial relativa que el blanco.

La Argentina produce alrededor del 2% del total de poroto seco a nivel mundial, sin embargo, es el cuarto exportador después de Mianmar (ex Birmania), China y Estados Unidos. Según el año, la Argentina interviene en las exportaciones con porcentajes que van desde el 10 al 22 % del total mundial, destinándose el 90 % de la producción nacional a la exportación y el resto al mercado interno, semilla, enlatados, etc.

Existen dos mercados y producciones de poroto bien diferentes. El de poroto negro, dirigido principalmente a países latinoamericanos y africanos y el de poroto alubia, destinado a países europeos del Mediterráneo. Un tercer segmento, involucra la explotación de porotos de altísimo valor, como ovales, coral, cranberrys, colorados, carioca, adzuky, navy bean y otros. En la Tabla 1.A se presentan las estadísticas de exportación de los últimos años.

La zona de producción de porotos secos se concentra en la región del Noroeste Argentino (NOA) que corresponde a las provincias de Salta, Jujuy, Santiago del Estero, Catamarca y Tucumán, en donde se produce el 99% del total nacional. Además, participan con pequeños volúmenes las provincias de Buenos Aires, Chaco, Córdoba y Santa Fe.

Tabla 1.A. Exportación argentina de poroto alubia y poroto negro por destino.

Poroto blanco			Poroto negro		
País	**Toneladas**	**%**	**País**	**toneladas**	**%**
España	27.718	35,3	Venezuela	73.095	35,3
Italia	15.921	20,3	Brasil	50.555	20,3
Portugal	6.967	8,9	Costa Rica	13.121	8,9
Brasil	6.238	7,9	Resto	5.435	22,2
Francia	4.223	5,4	**Total**	142.206	
Resto	17.431	22,2			
Total	78.498				

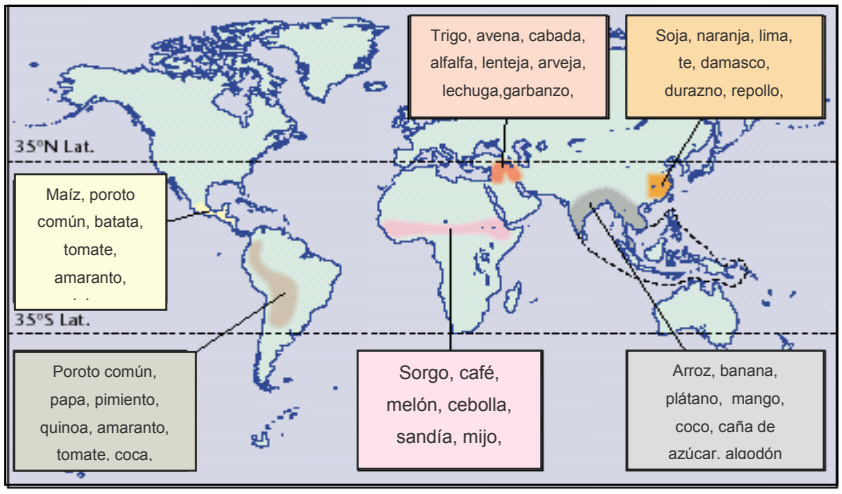
Centros de domesticación de las especies cultivadas

La domesticación es un proceso evolutivo llevado a cabo por el hombre, que consiste en inducir cambios genéticos que resultan en modificaciones morfológicas o en los hábitos de crecimiento, conducentes a la adaptación de las plantas a las condiciones ambientales de cultivo (Harlan, 1992). Los primeros eventos de domesticación coinciden con los comienzos de la agricultura, hace aproximadamente 10.000 años. Se considera como el origen de la agricultura, el

momento en que el hombre comenzó a recolectar semillas de plantas silvestres con el fin de sembrarlas y cultivarlas para obtener alimento. Simultáneamente, en varios lugares del planeta se produjo un cambio en los hábitos de los pueblos, que pasaron de nómades a sedentarios. Esto fue acompañado por el desarrollo de una economía basada en la agricultura, que tuvo profundas consecuencias para el hombre, su modo de vida y su ambiente (Gepts y Papa, 2002).

El origen y la evolución de las plantas cultivadas se trazaron utilizando los patrones geográficos de variación. De Candolle, botánico del siglo XIX, en su libro Origen de las Plantas Cultivadas, publicado en 1886, utilizó diferentes criterios para localizar las regiones de origen de un gran número de dichas plantas, por ejemplo ciertas características morfológicas, la distribución de los ancestros silvestres, la existencia de restos arqueológicos que demuestran la transición del estado silvestre al cultivado, y además, los argumentos históricos y lingüísticos disponibles. En 1951 Vavilov, genetista y agrónomo ruso, en una obra sobre el estudio de las plantas cultivadas dedicada a De Candolle, propuso identificar a las áreas de origen por el análisis de los patrones de variación y consideró, como “centros de origen”, a las regiones donde se encontraba la mayor diversidad genética de las especies. En dicho trabajo propuso ocho centros, algunos de los cuales aún son aceptados por numerosos especialistas. Asimismo, en base a la información obtenida de estudios arqueológicos y genéticos se identificaron diferentes centros de domesticación (Figura 1.2).

Figura 1.2. Centros de domesticación de cultivos (Gepts y Papa, 2002)



Harlan (1971) a partir del estudio de la distribución de cada cultivo y de sus ancestros silvestres observó una gran variedad de patrones geográficos y sugirió la existencia de dos grupos de especies cultivadas, uno con origen geográficamente localizado y definido (ej. trigo) y otro en el que la domesticación ocurrió en extensos territorios y por lo tanto, con una amplia distribución geográfica de sus parientes silvestres (ej. sorgo, banano y poroto). En base a esta estrategia de domesticación se les dio el nombre de cultivos céntricos y no-céntricos (Harlan, 1992).

Los principales centros de domesticación de las especies cultivadas se encuentran concentrados en áreas tropicales ubicadas entre los 35° de latitud Norte y los 35° de latitud Sur, las que están sujetas a estaciones secas y húmedas (Figura 1.2) (Gepts y Papa, 2002).

Ubicación taxonómica y características generales de *Phaseolus vulgaris*

El poroto común, *Phaseolus vulgaris* L., pertenece a la familia Leguminosae, subfamilia Papilionoideae, tribu Phaseoleae, subtribu Phaseolinae. Es una especie autógama (2n=2x=22) con tallo y hojas pubescentes, amplias, de 7 a 12 cm de longitud, trifolioladas, membranosas, con folíolos ovado-acuminados, laterales

asimétricos y el terminal distante. Las flores se presentan en racimos axilares generalmente con pocas flores, que son papilionáceas con 10 estambres. La corola es violácea, lila o blanca, con estandarte redondeado, reflejo, alas extendidas y quilla pequeña. El fruto es una legumbre péndula acuminada, cilíndrico-subcomprimida, delgada en la base, de 6 a 20 cm de longitud, de forma y color diferente según las variedades (Burkart, 1943).

De las 54 especies del género *Phaseolus* sólo cinco fueron domesticadas: *P. vulgaris* L. (common bean)*, P. lunatus* L. (lima bean)*, P. coccineus* L. (runner bean)*, P. acutifolius* A. Gray (tepary bean) y *P. dumosus* Macfady (= *polyanthus*; year bean) (Debouck, 1991) (Tabla 1.B). Entre todas las especies de *Phaseolus, P. vulgaris* es la que mejor se adapta a una gran diversidad de ambientes y probablemente debido a esto, dicha especie ocupa más del 90% de la superficie mundial sembrada con poroto (Allen y Allen,1981).

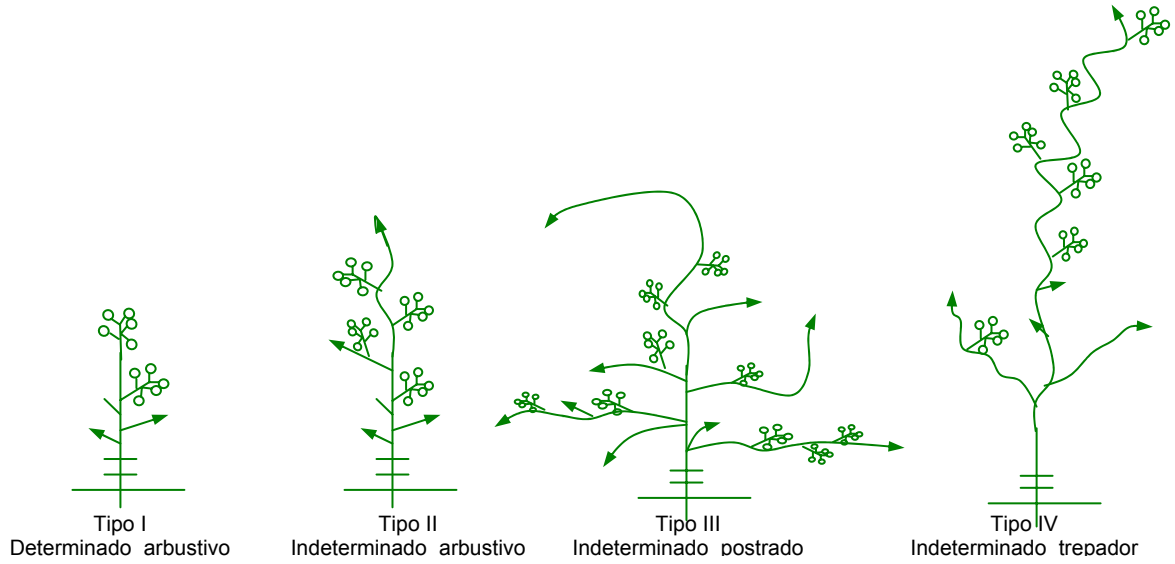
Phaseolus vulgaris presenta polimorfismos en ciertos caracteres morfoagronómicos, como por ejemplo el hábito de crecimiento, algunas características de las semillas y los días que transcurren desde la germinación a la madurez, entre otros. Estos caracteres están estrechamente relacionados con los sistemas de cultivo, las condiciones ambientales de las zonas de adaptación y los tipos de grano. Los parámetros utilizados para caracterizar e identificar el hábito de crecimiento de las plantas de poroto son: el tipo de crecimiento de la yema terminal (determinado o indeterminado), el número y la longitud de los entrenudos, la altura de la planta, y el grado y tipo de ramificación.

Tabla 1.B. Especies que componen el género *Phaseolus* (Debouck, 1991).

P. acutifolius A. Gray	*P. jaliscanus* Piper	*P. pedicellatus* Bentham
P. amabilis Standley	*P. leptostachyus* Bentham	*P. pluriflorus* M.M.S.
P. amblyosepalus (Piper) Morton	*P. lunatus* L.	*P. polyanthus* Greenman
P. angustissimus Asa Gray	*P. macrolepis* Piper	*P. polymorphus* S. Wats.
P. augusty Harms	*P. maculatus* Scheele	*P. polystachyus* (L.) B.S.P.
P. brevicalyx Micheli	*P. micranthus* Hook. & Arn	*P. ritensis* Jones
P. chiapasanus Piper	*P. microcarpus* Mart.	*P. salicifolius* Piper
P. coccineus L.	*P. minimiflorus* Norvell	*P. scabrellus* Bentham
P. costaricensis Freytag & Debouck	*P. neglectus* Hermann	*P. schaffneri* Piper
P. esperanzae Seaton	*P. nelsonii* M.M.S.	*P. sempervirens* Piper
P. filiformis Bentham	*P. oaxacanus* Rose	*P. sinuatus* Nutt
P. floribundus Piper	*P. oligospermus* Piper	*P. smilacifolius* Pollard
P. foliaceus Piper	*P. ovatifolius* Piper	*P. sonorensis* Standley
P. glabellus Piper	*P. pachyrrhizoides* Harms	*P. striatus* Brandegee
P. glaucocarpus Norvell	*P. palmeri* Piper	*P. tuerckheimii* Donn. Smith
P. grayanus Woot. & Standl.	*P. parvifolius* Freytag	*P. venosus* Piper
P. griseus Piper	*P. parvulus* Greene	*P. vulgaris* L.
P. hintonii Delgado	*P. pauciflorus* Seseé Mociño	*P. xanthotrichus* Piper

Los hábitos de crecimiento observados varían, desde determinado erecto (I); indeterminado erecto (II); indeterminado rastrero (tallo débil no trepador o semitrepador) (III) a indeterminado trepador (IV) (Figura 1.3). El tamaño de la semilla se mide por el peso de un número fijo de semillas (50, 100 o 1000) y varía de <15 a > 60 g/100 semillas (García Medina *et al*., 1993). La forma de las semillas puede ser elíptica, cilíndrica, arriñonada (Kidney), romboidea, oval o redonda. Esta además presenta grandes variaciones en el color de la testa y en la distribución de manchas, rayas, vetas, moteado, etc. (Figura 1.4). Los días desde la germinación a la madurez pueden variar de 70 a 200 (Singh, 1992).

Figura 1.3. Tipos de hábitos de crecimiento observados en el poroto común.

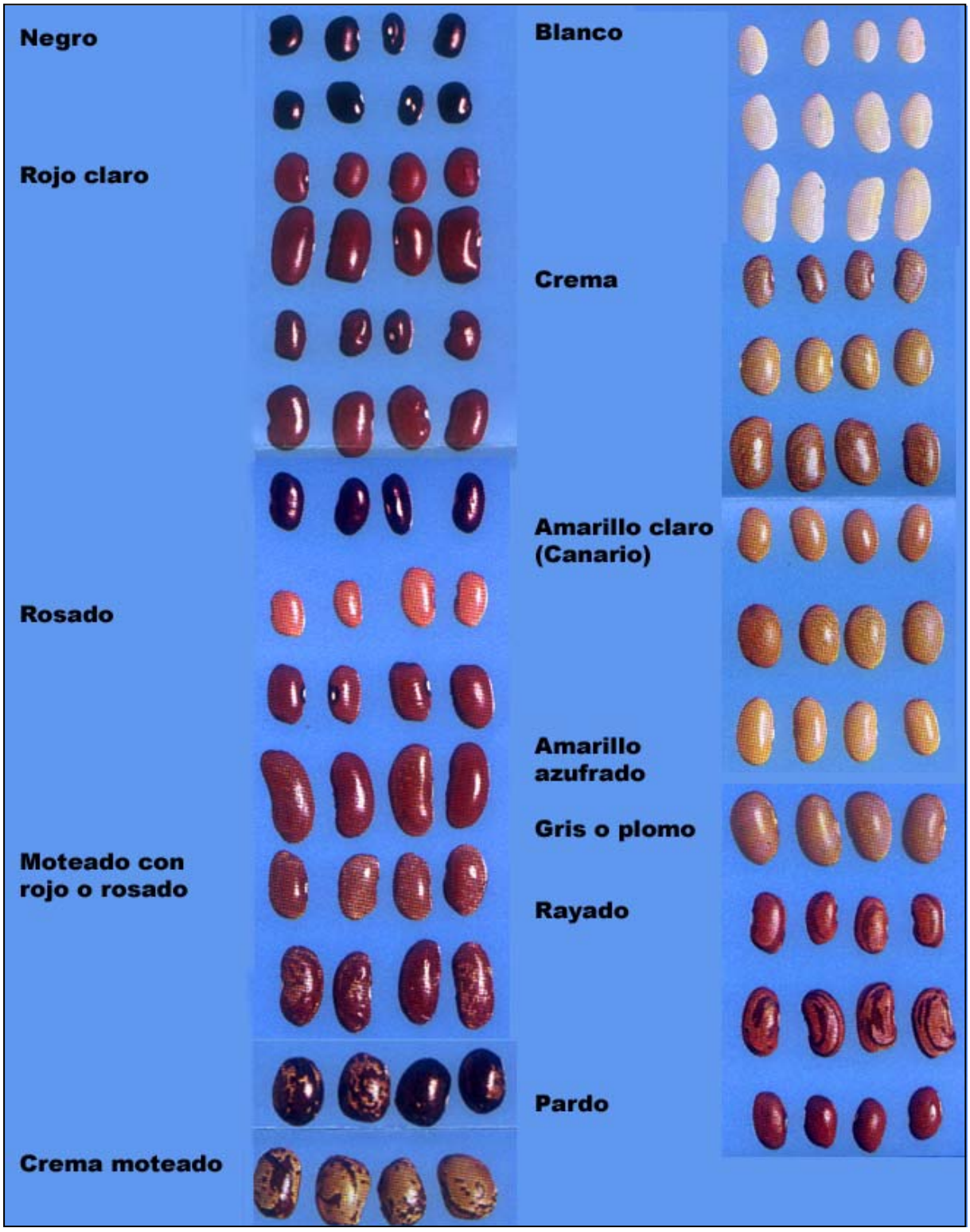


Acervos génicos de *Phaseolus vulgaris*

El poroto común presenta cuatro acervos génicos que se reconocen de acuerdo al grado de compatibilidad sexual con otras especies afines y/o variedades (Debouck, 1999; 2000).

El **acervo génico primario** de *Phaseolus vulgaris* comprende las dos variedades silvestres (*Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* y *Phaseolus vulgaris* var. *mexicanus*) y los porotos cultivados, incluyendo las razas locales o primitivas, con los que se cruza y produce progenies fértiles. Los porotos silvestres son plantas anuales, herbáceas y trepadoras, que crecen y se distribuyen libremente, cubriendo una distancia de más de 7000 km desde la localidad de Chihuahua ubicada al norte de México hasta la provincia de Salta en el norte de la República Argentina (Harlan, 1992). Las razas primitivas están formadas por mezclas de genotipos y fueron cultivadas durante cientos de años por poblaciones aborígenes para el consumo y con fines estéticos y ornamentales. Actualmente son mantenidas por los pequeños agricultores en sistemas de cultivo tradicionales.

Figura 1.4. Diversidad observada en las semillas de poroto común *Phaseolus vulgaris* L. (ilustración tomada de Voysest, 2000).



El **acervo génico secundario** del poroto común incluye a: *P. coccineus* L., *P. costaricensis* Freytag & Debouck, y *P. polyanthus* Greenman. Estas especies presentan un menor grado de compatibilidad genética con *Phaseolus vulgaris*. Los híbridos que se generan como resultado de los cruzamientos con *P. vulgaris* son parcialmente estériles lo que impide la recuperación de fenotipos estables (Singh, 2001).

El **acervo génico terciario** incluye un grupo de especies que tienen dificultades para transferir genes a *P. vulgaris*, siendo necesario recurrir al cultivo embrionario, del híbrido o de su descendencia. Frecuentemente, para restaurar la fertilidad de los híbridos es necesario realizar una o más retrocruzas con el progenitor recurrente. Dentro del acervo génico terciario del poroto común se encuentran las especies *P. acutifolius* Gray y *P. parvifolius* Freytag.

El **acervo génico cuaternario** incluye las especies de *Phaseolus* que presentan mecanismos de aislamiento genético efectivos en relación al acervo primario, por lo que siempre es necesario recurrir a técnicas de ingeniería genética para lograr una transferencia de genes efectiva (fusión de protoplastos, rescate embrionario trasferencia de cromosomas, etc.). Las especies *P. filiformis* Bentham, *P. angustissimus* Asa Gray, y *P. lunatus* L. se consideran miembros del acervo génico cuaternario del poroto común.

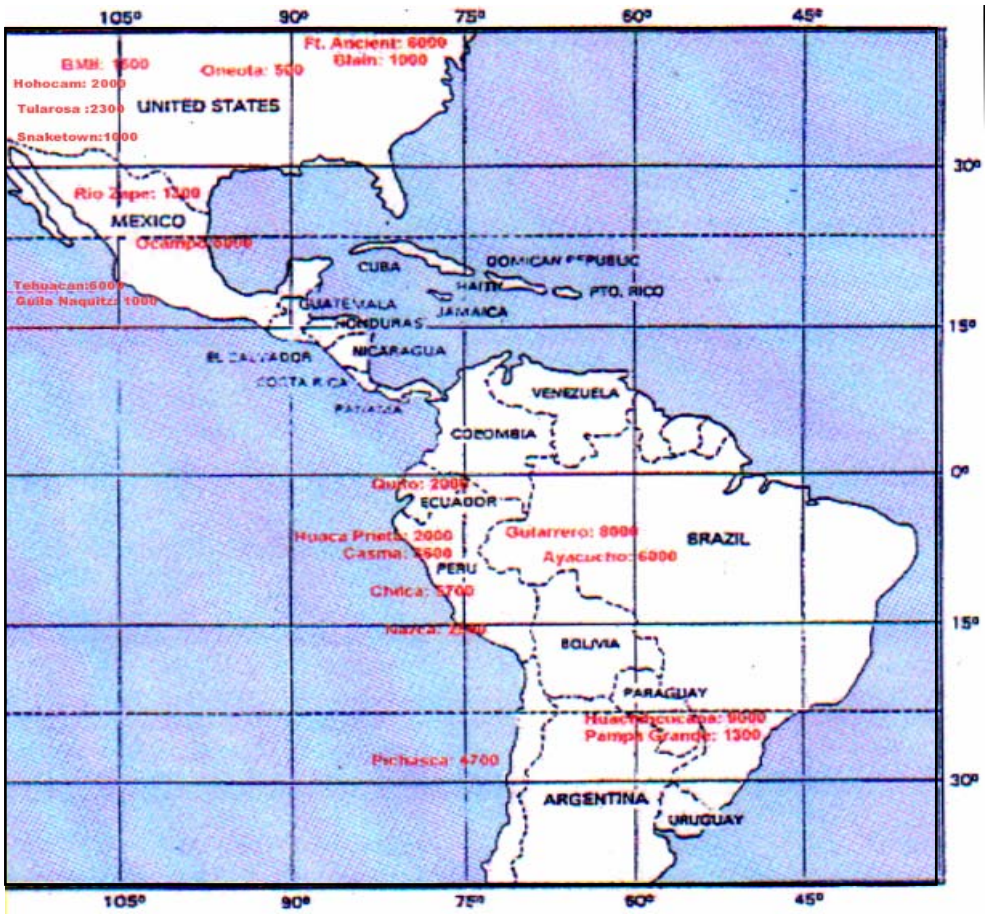
Origen y centros de diversificación de *Phaseolus vulgaris*

Durante siglos se consideró que *Phaseolus vulgaris* era de origen asiático. Sin embargo Wittmack (1980), basándose en observaciones de restos arqueológicos hallados en Perú y en el suroeste de los Estado Unidos, concluyó que el poroto común se había originado en América. A partir de este descubrimiento y con el

transcurrir del tiempo, se fueron acumulando evidencias arqueológicas, históricas y morfológico-evolutivas en favor de esta hipótesis (Gepts y Debouck, 1991).

Los restos arqueológicos consisten en semillas, fragmentos de vainas e incluso plantas completas halladas en América del Norte, Central y del Sur. Los restos más antiguos se encontraron en la Quebrada de Humahuaca en la provincia de Jujuy, Argentina con más de 9000 años de antigüedad (Figura 1.5). Otros datos históricos incluyen textos en español del siglo XVI, que mencionan la presencia del poroto común en América, y además datos lingüísticos que sugieren que varias lenguas indígenas nativas poseían una palabra específica para designar a dicho cultivo.

Figura 1.5. Distribución de los restos arqueológicos de poroto común y edad de los sitios (Gepts y Debouck, 1991).



Actualmente se distinguen cuatro centros primarios de diversificación de los porotos silvestres, los dos centros principales son el Mesoamericano y el Andino, habiéndose descripto además, dos centros menores que muestran polimorfismos únicos y que se encuentran al norte de los Andes: uno en Ecuador y norte de Perú, y otro en Colombia (Tohme *et al*., 1996, Broughton *et al.*, 2003). Según la mayor parte de los especialistas, una línea evolutiva derivada de un material ancestral de la zona de Ecuador y norte de Perú, habría dado origen a los porotos silvestres mesoamericanos y otra rama surgida de esta línea evolutiva, habría resultado en los porotos silvestres andinos, del sur de Perú, Bolivia y noroeste de la Argentina (Kami *et al*., 1995; Tohme *et al*., 1996) (Figura 1.6).

Figura 1.6. Centros de diversificación primaria de *Phaseolus vulgaris* en América (Broughton *et al*., 2003).

La existencia de estos cuatro centros primarios de diversidad genética, considerados pooles o acervos génicos, se encuentra avalada por evidencias morfológicas, bioquímicas (estudios de las proteínas de reserva e isoenzimas) y moleculares (Gepts *et al.*, 1986; Gepts, 1990; Koenig y Gepts, 1989; Singh *et al.*, 1991b; Nodari *et al.*, 1992; Becerra-Velasquez y Gepts, 1994). Dichos estudios sugieren además que el poroto común fue domesticado en diferentes zonas ecológicas. Como consecuencia de ello, dentro de los porotos cultivados se distinguen dos acervos génicos principales, uno Andino y el otro Mesoamericano, coincidentes con aquellos propuestos para los porotos silvestres (Debouck y Thome, 1988).

En África, Brasil, Europa, Medio Oriente y América del Norte se han descripto centros de diversificación considerados secundarios, que probablemente surgieron de poblaciones de poroto común que habrían inmigrado de los centros primarios (Broughton *et al*., 2003). Por ejemplo, en la Península Ibérica se ha documentado un centro secundario de diversificación genética especialmente en los porotos de tipo blanco (Santalla *et al*., 2002). Este nuevo germoplasma, conocido como "formas Ibéricas", podría haber sido el resultado de una recombinación inicial entre los germoplasmas Andino y Mesoamericano, con una posterior adaptación a las condiciones ambientales de la Península Ibérica tras la introducción del cultivo en Europa. Luego, estas nuevas formas Ibéricas se introdujeron en otras partes de Europa y de este modo contribuyeron a ampliar la diversidad genética observada en el germoplasma del poroto común Europeo (Gil y Ron, 1991; Santalla, 2002).

Domesticación del poroto común

Una cantidad de cambios morfológicos y fisiológicos se han producido durante el proceso de domesticación del poroto. Las plantas de poroto silvestre presentan

semillas pequeñas con cubiertas impermeables y dormición, hábito de crecimiento indeterminado y trepador, que producen vainas dehiscentes. La domesticación condujo a plantas de poroto que presentan un hábito de crecimiento determinado y arbustivo, semillas grandes, de cubiertas impermeables y sin dormición, que desarrollan en vainas indehiscentes, debido a la reducción de fibras en las vainas (Gepts y Gebouck, 1991) (Tabla 1.C). Más aún, el proceso de domesticación implicó la pérdida de pigmentación y reducción del contenido de sustancias tóxicas de la cubierta seminal, que aunque redujo la protección de las semillas frente a los predadores, resultó en una mejora del sabor (Smartt, 1988).

Tabla 1.C. Características morfológicas de las variedades silvestres y razas cultivadas de *Phaseolus vulgaris* (Gepts y Debouck, 1991).

Carácter	Silvestres	Cultivadas
Raíz	Fibrosa, fasciculada	Fibrosa: diferentes tamaños y morfología de acuerdo al hábito de crecimiento
Tallo	Trepador, multinodal	Trepador o erecto, multinodal o con pocos nudos
Entrenudos	Normalmente largos (10-20 cm)	Variables desde largos a cortos (2-5 cm)
Hojas	Folíolos de pequeños a intermedios	Folíolos pequeños o grandes
Altura de planta	2 a 5 cm	10 a 20 cm
Inflorescencia	Casi siempre lateral, 1 a 2 nudos fértiles	Dependiendo del hábito de crecimiento lateral y/o terminal, normalmente 2 nudos fértiles
Flores	Estandarte reflexo, flores color lila	Estandarte erecto, flores blancas y lilas
Vainas	Fuertemente dehiscentes, dehiscencia explosiva, de 6 a 8 cm.	Disminución de la dehiscencia, de 4 a 30 cm
Semillas	Pequeñas 6 a 10 g/100semillas	De mayor tamaño 20 a 100g/100 semillas

Otros caracteres que alteran sustancialmente la adaptación del poroto a los diversos ambientes de cultivo, son la pérdida de la dehiscencia de la vaina y la

dormición de la semilla. Además, la modificación de la respuesta al fotoperíodo ha permitido ampliar las áreas de cultivo de esta especie, transformándola de sensible al fotoperíodo en insensible. Al conjunto de los cambios morfológicos indicados se lo conoce como síndrome de domesticación y es el resultado de un proceso de selección y adaptación a ambientes de cultivo, que transcurrió pausada y continuamente durante miles de años.

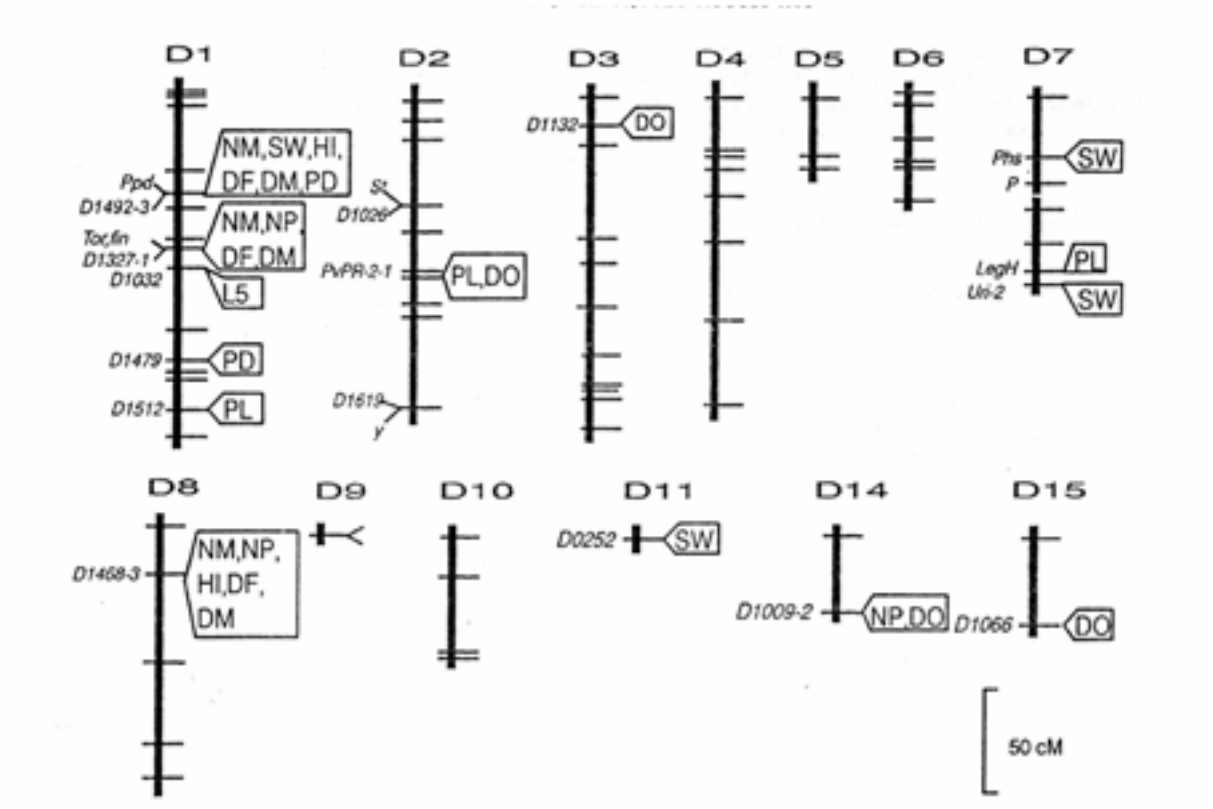
La domesticación es esencialmente un proceso de selección y el tiempo que dura este proceso depende del avance genético o ganancia genética (Δg), la cual varía según la intensidad de selección, el desvío estándar fenotípico y la heredabilidad.

En términos evolutivos el avance genético durante la domesticación depende de la variabilidad genética en las poblaciones silvestres (Gepts y Debouck, 1991). Esto incluye a los caracteres que contribuyen a diferenciar a los porotos silvestres de los cultivados, la heredabilidad de los mismos y la presión de selección ejercida por los primeros agricultores.

La regulación génica del síndrome de domesticación involucra genes de efecto mayor, con un marcado efecto fenotípico y con alta heredabilidad, cuya expresión explica la mayor parte de la variabilidad observada (>60%) (Koinange *et al*., 1996). Los genes que regulan y codifican este complejo conjunto de caracteres fueron identificados y ubicados en el mapa de ligamiento del poroto (Figura 1.7). Por ello, Gepts y Debouck (1991) propusieron que la domesticación del poroto común probablemente se produjo en un período de tiempo corto, dependiendo principalmente de la intensidad de la presión de selección ejercida durante el proceso de domesticación. Apoyaría esta hipótesis el hecho de que todos los restos arqueológicos encontrados corresponden a porotos completamente domesticados. Los registros más antiguos datan de 10.000 a 8.000 años desde la actualidad y

fueron encontrados en Callejón de Huaylas (Ancash, Perú) y en Huachichocana (Jujuy, Argentina) (Kaplan *et al*., 1973; Tarragó, 1980).

Figura 1.7. Mapa de ligamiento con la localización de los genes que controlan el síndrome de domesticación en poroto común. Los símbolos a la izquierda de los grupos de ligamiento son marcadores moleculares. Los símbolos de genes para caracteres cualitativos son: "*St",* sutura de la vaina; "*y",* color amarillo de la vaina. Los símbolos a la derecha de los grupos de ligamiento son loci de caracteres cuantitativos: DF, días a floración; DM, días a madurez; DO, dormición de la semilla; HI, índice de cosecha; L5, largo del quinto entrenudo; NM, número de nodos en el tallo principal; PL, longitud de vaina; NP, número de vainas por planta; PD, sensibilidad al fotoperíodo (floración tardía); SW, peso de semilla (Epimaki *et al*., 1996).



Características de los porotos domesticados

El estudio y análisis de los caracteres morfológicos (Evans, 1976), como así también de los marcadores bioquímicos (proteínas de reserva e isoenzimas) y de los marcadores moleculares (Gepts *et al.*, 1986; Gepts, 1990; Koenig y Gepts, 1989; Singh *et al*., 1991a; Nodari *et al.*, 1993; Becerra-Velasquez y Gepts, 1994), sugieren que dentro de los porotos cultivados se distinguen dos acervos o pooles génicos principales, uno Andino y otro Mesoamericano, coincidentes con aquellos reconocidos para los porotos silvestres (Debouck y Thome, 1988).

Los acervos génicos Mesoamericano y Andino de los porotos domesticados presentan diferencias morfológicas y bioquímicas, algunas de las cuales tendrían un significado adaptativo (ventajas adquiridas por selección natural o artificial) en relación con determinados hábitats ecológicos (Singh *et al*., 1988). En la Tabla 1.D se brinda una lista de caracteres “primitivos” (similares a los de las variedades silvestres) presentes en los acervos génicos cultivados Mesoamericano y Andino, como así también una lista de caracteres “adaptativos” que han sido seleccionados en estas áreas de domesticación.

Los caracteres considerados primitivos o ancestrales para el poroto común contribuyen a identificar los centros de domesticación. Entre estos se incluye la forma de la hoja, el tipo Mesoamericano posee el folíolo central ovalado y el tipo Andino romboédrico (Singh *et al*., 1988).

Las preferencias y necesidades de las civilizaciones precolombinas se hallan expresadas en gran medida en la selección producida en las áreas de domesticación. Por ejemplo, el tamaño de la semilla es menor en el grupo de porotos Mesoamericanos (pequeño < 25g y mediano entre 25 y 40g/100 semillas), que en el grupo de porotos de origen Andino (mediano y grande >40g/100 semillas). Asimismo, existen marcadas diferencias en las respuestas a distintas temperaturas

y fotoperíodos, tanto entre porotos procedentes de diferentes centros de domesticación, como entre aquellos de distintos ambientes dentro de esos mismos centros. Por ejemplo, algunas razas domesticadas de poroto común crecen a nivel del mar en zonas tropicales (temperatura promedio de crecimiento 25°C), en tanto que otras lo hacen a 3000 m de altura (temperatura promedio de crecimiento de 12 a 15°C). En consecuencia es probable que si se cultiva germoplasma del altiplano en tierras bajas éste no florezca y viceversa.

Tabla 1.D. Caracteres adaptativos y primitivos de *Phaseolus vulgaris* L. que diferencian a los porotos de los acervos génicos Andino y Mesoamericano.

Carácter	Centro Mesoamericano	Centro Andino
Primitivo		
Folíolo central de la hoja	Ovalado	Romboédrico, alargado
Bracteola	Oval ancha	Delgada, alargada o lanceolada
Base del estandarte	Con rayas (a menudo)	Uniforme
Inflorescencia	Nudos múltiples	Nudos escasos
Faseolina[1]	S, Sb, Sd, B	T, C, H, A
Isoenzimas[2]	*Diap*-1^{95},*Lap*-3^{100}, *Rbc*^{100},*Skdh*^{103}	*Diap*-1^{100},*Lap*-3^{103}, *Rbc*^{98},*Skdh*^{100}
Adaptativo		
Tamaño de semilla	Pequeño-mediano <40g/100 semillas	Grande >40g/100 semillas
Posición del ápice vaina	Sutura dorsal	Entre suturas dorsal y ventral
Tricomas de la hoja	Escasos y pequeños	Densos y grandes
Forma de la semilla	Elíptica, romboide y redonda	Cilíndrica, arriñonada, ovalada y redonda

[1] Proteína de almacenamiento de la semilla. Tipos de faseolina nombrados según el lugar o los cultivares en los que se hallaron: T: Tendergreen, C: Contender, S: Sanilac (Sd: Durango, Sb: Brasil), A: Ayacucho, H: Huachichocana, B: Belize. [2] *Rbc*: ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa, *Skdh*: shikimato deshidrogenasa, *Diap*: diaforasa-1, *Lap*: aminopeptidasa-3 de leucina.

Las características ancestrales y de adaptación al hábitat ecológico permitieron identificar en el germoplasma de poroto común cultivado seis razas, tres de origen Mesoamericano (Durango, Jalisco y Mesoamérica) y tres de origen Andino (Chile, Perú y Nueva Granada) (Singh *et al*., 1988). Las características de cada una de estas razas se presentan en la Tabla 1.E.

Tabla 1.E. Características de las razas de poroto común cultivado (*P. vulgaris* L.) y de sus hábitats en los centros primarios de domesticación de América (Singh *et al.*, 1988).

Raza	Tamaño [1] y color de semilla	Variedades	H. C.[2]	Faseolina	T° crecimiento	Hábitats
Pool Mesoamericano						
Durango	Mediana. Todos los colores	Pinto, Great northern, Red Mexican, Bayo, Ojo de Cabra	III	S, Sd	20 °C	Altiplano semiárido de México y suroeste de Estados Unidos
Jalisco	Mediana. Beige, rosado, amarillo	Fríjola, Flor de Mayo, Conejo, Apetito	IV	S	18 °C	Altiplanicies húmedas de México y Guatemala
Mesoamérica	Pequeña. Todos los colores	Brasil, Kupal, Jamapa, Porrillo, Carioca, Mulatinho	I, II, III y IV	S, Sd, B	22 °C	Mesoamérica, Colombia, Venezuela, Brasil.
Pool Andino						
Chile	Mediana, ovalada, redonda. Crema, rosado, gris, blanco	Cranberry, Tortolas, Borlotos, Suave, Bolita Cristal	III	C, H	22 °C	Sur de Los Andes y Chile
Perú	Mediana y grande, ovalada, redonda. Rojo, rosado, crema, blanco	Overitos, Nuñas, Bola roja, Mortiño, Cargamanto	IV	T, C, H, A	16 °C	Altiplanicies de Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Argentina.
Nueva Granada	Mediana y grande alargada. Rojo, rosado, beige, crema, amarillo, blanco	Uribe, Calima, Canario, Chabelo, Jalo, Alubia	II y III	T	20 °C	Altitudes intermedias de Los Andes de Colombia, Ecuador y Perú. Bolivia, Brasil, Haití.

[1]Peso de 100 semillas: pequeña <25g, mediana entre 25 y 40g, grande >40g. [2] Hábito de crecimiento.

Análisis de la variabilidad genética.

Marcadores bioquímicos

Hasta mediados de la década del 60, los estudios de variabilidad genética poblacional se basaron casi exclusivamente en el análisis de los caracteres morfológicos. Estos marcadores contribuyeron significativamente al desarrollo teórico del análisis de ligamiento genético y a la construcción de los primeros mapas genéticos. Sin embargo, con el descubrimiento de la variación estructural de las

proteínas (isoenzimas y proteínas de almacenamiento de las semillas) se dispuso de un mayor número de recursos técnicos para describir la variabilidad genética de las especies (Kelly y Miklas, 1996). Las isoenzimas son múltiples polipéptidos que comparten la misma actividad catalítica, pero poseen diferentes propiedades cinéticas. La diferencia en la movilidad de las isoenzimas en un campo eléctrico es el resultado de diferencias en los polipéptidos, los que están codificados en las secuencias de ADN. El principio básico de la técnica reside en la separación de los polipéptidos por electroforesis en geles de almidón, visualizándose el producto enzimático por métodos histoquímicos (Grattapaglia y Ferreira, 1996).

Estos marcadores bioquímicos revelan niveles de polimorfismo superiores a los caracteres morfológicos y permiten identificar la variabilidad genética de las especies con mayor precisión. Sin embargo, presentan la desventaja de que, para muchas especies, existe un número limitado de marcadores y en algunos casos la variabilidad evidenciada a nivel infraespecífico es muy baja. Por otro lado, la expresión de los marcadores proteicos al igual que los caracteres morfológicos, se halla bajo la influencia del ambiente. Por ello en el análisis de poblaciones es más preciso utilizar métodos moleculares que no estén influenciados por el ambiente (Murphy *et al*., 1996).

En los porotos cultivados se encontró que la principal proteína de reserva de las semillas, la faseolina, presentaba patrones electroforéticos diferentes (Gepts y Bliss, 1988). Esta proteína es una globulina con un coeficiente de sedimentación de 7S que es soluble a altas concentraciones salinas y que representa aproximadamente el 50% de las proteínas totales de la semilla. Se identificaron diferentes patrones electroforéticos de faseolina entre los porotos cultivados, “S”, “T” y “C”, que deben su nombre a los cultivares “Sanilac”, “Tendergreen” y “Contender”,

respectivamente. Los patrones de faseolina “H” y “A” se identificaron a partir de poblaciones de porotos primitivos de Perú “Huevo de Huanchaco” y “Ayacucho”.

El uso de marcadores bioquímicos como la faseolina, permite realizar mapas genéticos y puede ser usado como marcador en la selección de materiales y en estudios de domesticación (Gepts y Bliss, 1988; Kelly y Miklas, 1996). La faseolina también se utilizó como marcador para incrementar el contenido proteico de las semillas del poroto común (Kelly y Miklas, 1996). Mediante electroforesis es posible detectar los cambios en el peso molecular y el punto isoeléctrico de las proteínas que resulta de la divergencia genotípica. Por lo tanto la faseolina es una herramienta útil para analizar las relaciones de parentesco entre cultivares, razas locales y poblaciones silvestres (Rodiño *et al.*, 2001).

Las faseolinas y las isoenzimas se emplearon como marcadores para estudiar la variabilidad genética de los porotos silvestres (Singh *et al.*, 1988). Se identificaron más de 40 patrones de faseolinas y se observó que existen más morfotipos proteicos en los materiales silvestres que en los cultivados (Gepts y Bliss, 1988; Thome *et al*., 1996). También con los patrones de isoenzimas se observó gran variabilidad en las poblaciones silvestres (Koenig y Gepts, 1989; Singh, 1991; Santalla *et al*., 2003). Estos estudios demostraron que sólo una porción de la diversidad genética presente en las especies silvestres fue domesticada. Más aún, las evidencias sugieren la existencia de un efecto fundador en la domesticación del poroto, el que se define como la reducción de la variabilidad genética debido a que los individuos que conforman una nueva población sólo portan una parte de la variabilidad genética original. Asimismo, el flujo de genes entre las reservas domesticadas y sus contrapartes silvestres fue limitado, ya que a partir de un estado silvestre con cierto grado de polinización cruzada, se originaron formas domesticadas que tendieron a un mayor nivel de autogamia (Santalla *et al.*, 2003).

Esto último probablemente condujo a una reducción aún mayor de la variabilidad de los cultivares, resultando en la disminución de la frecuencia o eliminación de alelos, que eventualmente pueden codificar características deseables (por ej. resistencia a insectos, especificidad para cepas de *Rhizobium*, etc.).

Koenig *et al.* (1990) y Gepts *et al.* (1986) utilizaron la electroforesis de dos dimensiones para caracterizar patrones de faseolinas de porotos mesoamericanos y andinos, y para describir nuevos patrones de faseolinas observados en porotos primitivos de Ecuador y Perú, conocidos como ñuñas (Tohme *et al.*, 1995). Por otro lado, Gepts *et al.* (1986) demostraron que a partir de un único patrón de faseolina tipo "M" observado en electroforesis unidimensional se obtuvieron más de tres perfiles distintos en geles de dos dimensiones. Es posible que el análisis electroforético en dos dimensiones permita identificar un mayor nivel de variabilidad con más precisión, sin embargo los marcadores moleculares son más eficientes para detectar polimorfismos a nivel poblacional comparado con los patrones proteicos (Freyre *et al.,* 1996; Cattan-Toupance *et al.,* 1998; Santalla *et al*., 2003) debido en parte, a que los marcadores moleculares permiten analizar mas ampliamente el genoma dado que amplifican tanto regiones codificantes como no codificantes.

Marcadores moleculares

El desarrollo de la Biología Molecular a fines de la década del 80 y principios del 90 permitió aislar el ADN, fragmentarlo por medio de las enzimas de restricción (endonucleasas) y amplificarlo más de 300 millones de veces (Mullis y Faloona, 1987). Estos conocimientos condujeron al desarrollo de técnicas más precisas para el estudio y análisis de la variabilidad genética de las especies cultivadas.

Entre dichas técnicas se encuentran los mapas de restricción que se basan en la utilización de enzimas de restricción. Estas reconocen cierta secuencia de bases (sitios de restricción) y cortan al ADN genómico en un gran número de sitios,

generando así una cantidad variable de fragmentos, que se separan en base a su tamaño en un gel de agarosa sometido a una corriente eléctrica (electroforesis submarina) (Brown, 1995). La diferencia en el tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos a partir de la digestión de ADN de diferentes individuos indica diferencias en la secuencia de ADN, generada por mutaciones puntuales en los sitios de restricción, por inserciones o por deleciones.

Las enzimas de restricción también permiten realizar el análisis de polimorfismos generados a partir de la diferencia en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism) (Botstein *et al.*, 1980). La técnica de **RFLP** consiste en la utilización de una enzima de restricción, que corta el ADN genómico generando un número de fragmentos del orden de 10^4 a 10^7, dependiendo del tamaño del genoma y del número de bases que reconoce la enzima. Para detectar los marcadores RFLP, los fragmentos de ADN se separan por electroforesis en un gel de agarosa, se transfieren a una membrana de nylon (o nitrocelulosa) por un proceso denominado Southern Blot y se hibridan con pequeños fragmentos de ADN sintetizados con nucleótidos marcados (sondas), que son secuencias homólogas al ADN inmovilizado en la membrana (Botstein *et al.*, 1980). Las bandas se visualizan por exposición a un film fotográfico (autorradiografía). Los polimorfismos observados en los individuos por medio de la técnica de RFLP, se deben a que el número de sitios de restricción (de 4 a 8 pares de bases) presentes en el ADN genómico puede variar, como resultado de rearreglos genéticos (mutaciones, deleciones, inserciones, etc.). Estos alteran la secuencia de los sitios de corte de las enzimas o las distancias entre sitios de restricción, generando fragmentos de diferentes tamaños, por lo cual es posible observar que las sondas marcadas se encuentran en fragmentos de ADN de diferente tamaño (Grattapaglia y Ferreira, 1996).

Con el desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR-Polymerase Chain Reaction, ver Anexo 2 página 177) (Saiki *et al*., 1985), que consiste en la síntesis enzimática *in vitro* de múltiples copias de ADN, se desarrollaron otras técnicas moleculares para el análisis de la diversidad poblacional. Entre ellas se encuentran: la técnica de **RAPD** (Randomly Amplified Polymorphic DNA; Williams *et al*., 1990; Welsh y Mc Clelland, 1990), **AFLP** (Amplified Restricction Fragment Length Polymorphism; Vos *et al.*, 1995), **SSR** (Simple Sequence Repeats; Tautz, 1989) y de **ISSR** (Inter-Simple Sequence Repeats; Zietkiewicz *et al*., 1994).

La técnica de **RAPD** consiste en la amplificación al azar de fragmentos de ADN genómico empleando cebadores o primers de secuencia arbitraria. Estos se distribuyen al azar en las secuencias genómicas permitiendo analizar genes y regiones intergénicas, sin necesidad de conocer las secuencias del ADN (Williams *et al*., 1990; Welsh y Mc Clelland, 1990). La metodología presenta muchas ventajas pero también ciertas desventajas, por ejemplo la dificultad de repetir la reacción en distintos laboratorios, lo que dificulta la comparación de los resultados obtenidos por distintos especialistas (Grattapaglia y Ferreira, 1996). Entre las ventajas cabe consignar que no requieren del conocimiento previo de las secuencias genómicas a amplificar y que el protocolo es relativamente simple, rápido y de bajo costo (Galván *et al*., 2001).

La técnica de **AFLP**, que combina de alguna manera los conceptos de RAPD y RFLP, se basa en el corte del ADN genómico con enzimas de restricción (endonucleasas), generando una cantidad variable de fragmentos. Los fragmentos son amplificados con “primers” de secuencia complementaria a sus extremos. Estos “primers” poseen además 1 o 2 bases arbitrarias en uno de sus extremos, lo que resulta en una amplificación selectiva de algunos de dichos fragmentos de ADN (Vos

et al., 1995). Los polimorfismos observados en los individuos por medio de esta técnica, se deben a que el número de sitios de restricción (de 4 a 8 pares de bases) presentes en el ADN genómico puede variar, como resultado de rearreglos genéticos (mutaciones, deleciones, inserciones, etc.) (Grattapaglia y Ferreira, 1996). Estos cambios en ocasiones, alteran la secuencia de los sitios de corte de las enzimas o las distancias entre sitios de restricción, generando fragmentos de diferentes tamaños.

La técnica de **SSR** o microsatélites consiste en la amplificación de regiones del ADN que contienen secuencias simples (1 a 4 nucleótidos) repetidas y adyacentes. Para ello se utilizan "primers" de una secuencia específica de 20 a 30 bases, que son complementarios a las secuencias únicas que flanquean al microsatélite (Tautz, 1989). Es decir, que en este caso es indispensable conocer dichas secuencias en el genoma de la especie a analizar. El elevado polimorfismo revelado se debe a la variación en el número de repeticiones de los microsatélites. Al ser marcadores codominantes permiten la detección de individuos heterocigotas para los diferentes loci.

Los marcadores **ISSR** se generan amplificando el ADN genómico con primers de entre 15 y 25 bases, cuyas secuencias contienen dos, tres o cuatro bases repetidas en tandem. Igual que los RAPDs la técnica de ISSR consiste en una reacción de amplificación mediante PCR utilizando un único primer que hibrida en múltiples sitios del genoma y permite la amplificación de segmentos de ADN de distinta longitud (Zietkiewicz *et al*., 1994). La técnica de ISSR utiliza la secuencia de microsatélites como primers y permite la amplificación de secuencias inter-microsatelitales (inter-SSR). Estos cebadores sólo generan la amplificación de aquellas regiones del genoma flanqueadas por secuencias de ADN repetitivo ubicadas a menos de 5000 pares de bases. Los primers pueden ser sin anclaje o

presentar de 1 a 4 bases selectivas en los extremos 5` (anclaje 5`) o 3` (anclaje 3`). Los ISSR son más reproducibles que los RAPDs debido a que la longitud de la secuencia de los primers empleados es mayor y la temperatura de hibridación es más alta. Por ello se los utiliza con frecuencia en estudios poblacionales y de mapeo de genes.

Con el desarrollo de la secuenciación del ADN y de su automatización, surgieron técnicas más complejas para generar marcadores de los cuales los **SNP** (Single Nucleotide Polymorphism) son los más utilizados. Los SNP identifican diferencias entre individuos a través de variaciones en apenas un nucleótido, las que se detectan en secuencias de ADN codificante o no codificante. Existe un gran número de métodos para registrar polimorfismos de SNP. A diferencia de los marcadores mencionados anteriormente, los SNP no necesitan de la separación de fragmentos de ADN por tamaño, sino que pueden ser visualizados en placas para 96 o 384 muestras (Brookes, 1999). Aunque los SNP pueden ser detectados por secuenciación, frecuentemente los productos de amplificación se caracterizan por PCR mediante el uso de “primers” específicos.

Los marcadores SNP pueden ser utilizados para la construcción de mapas genéticos de alta resolución, mapeo de caracteres, diagnóstico genético, análisis de estructura genética de poblaciones y análisis filogenético, entre otros. Las principales ventajas de los SNP son: la alta frecuencia con que ocurren en el genoma, el elevado grado de polimorfismo (identificación de variaciones de ADN hasta un nucleótido) y la posibilidad de detectar diferentes alelos para genes de interés.

La tecnología para la identificación de SNP es más sofisticada y costosa que la de otros marcadores, y su desarrollo depende de secuenciar ADN a gran escala. Sin embargo, una vez que se dispone de los SNP, ellos pueden tener innumerables

aplicaciones. Con el avance de los proyectos genómicos en diversas especies será posible desarrollar marcadores de tipo SNP y esto con seguridad conducirá a que sean utilizados con más frecuencia en los programas de mejoramiento.

Además de los marcadores moleculares mencionados, basados en la amplificación del ADN mediante PCR, existen otras variantes de dichas técnicas con modificaciones menores (Tabla 1.F). Entre todos los marcadores moleculares disponibles se eligieron los RAPD e ISSR por razones de costos, eficiencia y experiencia previa sobre la puesta a punto de dichas técnicas en el equipo de investigación en el que se desarrolló este trabajo de tesis (Galván, 1999; Galván *et al*., 2001; Galván *et al.*, 2003).

Tabla 1.F. Marcadores moleculares basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Nombre		Referencia
DAF	DNA Amplification Fingerprinting	Caetano-Anolles *et al.* (1991)
AP-PCR	Arbitrarily Primed-PCR	Welsh y McClelland (1990)
SCAR	Sequence Characterized Amplified Regions	Paran y Michelmore (1993)
MP-PCR	Microsatellite Primed-PCR	Meyer *et al.* (1993)
SPAR	Single Primer Amplification Reaction	Gupta *et al.* (1994)
RAMPs	Random Amplified Microsatellite Polymorphism	Wu *et al.* (1994)
RAMS	Randomly Amplified Microsatellites	Hantula *et al.* (1996)
AMP-PCR	Anchored Microsatellite Primed-PCR	Weising *et al.* (1998)
STS	Sequence-Tagged Sites	Olson *et al.* (1989).
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence	Paran y Michelmore (1993)
STMS	Sequence Tagged Microsatellite Sites	Beckmann y Soller (1990)
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism	Vos *et al.* (1995)
SSR	Simple Sequence Repeats	Tautz (1989)
ISSR	Inter-Simple Sequence Repeat	Zietkiewicz *et al.* (1994).

Empleo de marcadores moleculares en el estudio de la variabilidad genética de *Phaseolus vulgaris*

Identificación y caracterización de los acervos génicos Mesoamericano y Andino

Powell *et al*. (1996) sugirieron que cualquier estimación de la similitud genética entre genotipos estaría afectada por el número y la distribución de los marcadores en el genoma (cobertura del genoma) y la naturaleza de los mecanismos evolutivos que originan la variación analizada. Debido a que los marcadores moleculares son altamente polimórficos y neutros, constituyen herramientas más apropiadas que las isoenzimas y las faseolinas, para el análisis de la variabilidad. En el poroto común, la hipótesis sobre la existencia de dos acervos génicos principales (Mesoamericano y Andino) en los porotos domesticados y silvestres, se comprobó en base al empleo de numerosos marcadores moleculares como RFLP (Becerra-Velasquez y Gepts, 1994; Hamann *et al*. 1995), secuencias específicas de ADN de cloroplastos (Khairallah *et al*., 1990; Chacón *et al.*, 2005), RAPDs (Haley *et al*., 1994; Johns *et al*., 1997; Duarte *et al*., 1999; Fofana *et al.*, 1997; Métais *et al*., 2000; Maciel *et al*., 2001; Galván *et al*., 2001; Caixeta-Franco *et al*., 2001), AFLP (Thome *et al*., 1996; Caicedo *et al*., 1999), ISSR (González *et al*., 1998; Galván *et al*., 2003; Serna *et al*., 2003) y SSR (Blair *et al*., 2006). Entre estos marcadores los RAPDs fueron los más extensamente utilizados debido a que el protocolo es relativamente simple, rápido y de bajo costo (Johns *et al*., 1997; Skroch *et al*., 1998; Duarte *et al*., 1999; Fofana *et al*., 1997; Métais *et al*., 2000; Maciel *et al*., 2001; Galván *et al*., 2001; Caixeta-Franco *et al*., 2001).

Maciel *et al*. (2003) emplearon marcadores AFLP para identificar las poblaciones de porotos de Brasil y los resultados obtenidos demostraron que la mayoría de ellas pertenece al acervo génico Mesoamericano. Sin embargo, a pesar de que los marcadores AFLP cubren gran parte del genoma, no tuvieron el poder

discriminante de las faseolinas a nivel de acervos génicos. Los AFLP son altamente polimórficos pero revelaron una tendencia de continuidad genética entre individuos que sería el resultado de transferencia de material genético entre regiones, deriva génica, y entrecruzamientos entre porotos primitivos y comerciales.

Los marcadores ISSR se emplearon para caracterizar e identificar cultivares comerciales de poroto común por acervo génico de origen. Estos demostraron ser marcadores más precisos que los RAPDs, y además altamente reproducibles (González *et al*., 1998; Galván *et al*., 2003; Serna *et al*., 2003). La presencia en el genoma de secuencias de microsatélites características de los acervos Andino y Mesoamericano, permitió discriminar claramente dichos acervos génicos en los cultivares comerciales presentes en el Noroeste Argentino (Ver Figura 1.9 pág. 41) (Galván *et al.*, 2003).

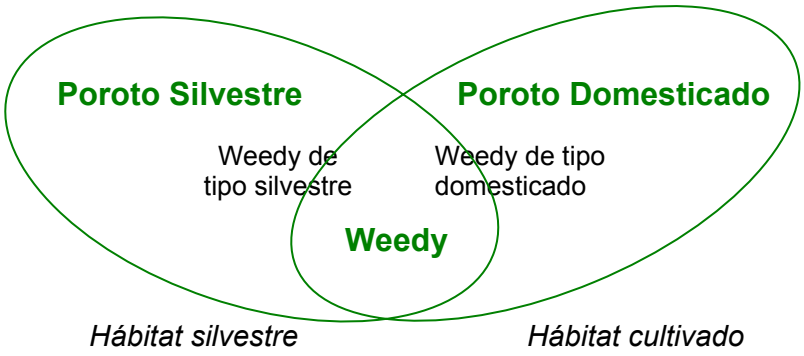
Caracterización de variedades silvestres y formas "weedy"

Los marcadores moleculares demostraron ser herramientas de gran utilidad para la identificación y caracterización de los acervos génicos principales, pero también para el análisis de la variabilidad genética presente en poblaciones de porotos silvestres Mesoamericanos y Andinos. Papa y Gepts (2003) estudiaron las poblaciones silvestres de Mesoamérica con AFLP y demostraron la presencia de una marcada estructuración geográfica de la diversidad. En los porotos silvestres de Mesoamérica existiría una gran diferenciación entre poblaciones, aún en distancias cortas (Freyre *et al.*, 1996). Por el contrario, en la región Andina el análisis de poblaciones de porotos silvestres del Noroeste de la Argentina mediante marcadores RAPD reveló una gran variabilidad intrapoblacional con una baja diferenciación entre poblaciones (Cattan-Toupance *et al.,* 1998).

Los marcadores moleculares también permiten analizar la intensidad del flujo génico entre porotos silvestres y domesticados en diferentes áreas. Los porotos

"weedy" ("weed": maleza) son el resultado del cruzamiento entre porotos silvestres y domesticados que están en simpatría. Como consecuencia de ello se produce una introgresión de genes desde los porotos silvestres hacia los domesticados o escapes a partir de los cultivos (Beebe *et al*., 1997). Los complejos "wild-weedy-cultivated" (Figura 1.8) surgen del cruzamiento entre porotos silvestres, cultivados y "weedy", y fueron observados principalmente en la zona andina de Bolivia, Perú, Colombia y Argentina (Debouck *et al.*, 1989; Beebe *et al*., 1997; Freyre *et al*., 1996; Menéndez Sevillano, 2002; Santalla *et al.*, 2003; Hoc *et al.*, 2006). Papa y Gepts (2003) usando marcadores AFLP demostraron que las poblaciones "weedy" de Mesoamérica forman un grupo intermedio entre las poblaciones domesticadas y silvestres, sugiriendo que se habrían originado por hibridación de ambas.

Figura 1.8. Esquema del complejo "wild-weedy-cultivated" o silvestre-maleza-cultivado (adaptado de Beebe *et al*., 1997).



La introducción de caracteres desde los porotos silvestres a los cultivados se dificulta por el carácter dominante de los genes que codifican para caracteres no domesticados (Gepts y Debouck, 1991; Singh, 1991). La caracterización morfológica y molecular de estos complejos facilita su utilización como intermediarios en los programas de mejoramiento, cuyo objetivo es transferir gradualmente caracteres de especies silvestres a variedades con mayores niveles de domesticación. Esto

permitiría complementar los programas de mejoramiento utilizando la variabilidad genética existente en los complejos "wild-weedy-cultivated" (Beebe *et al.*, 2000). Islam *et al*. (2004) midió el grado de introgresión espontánea en una muestra de porotos primitivos de origen andino usando caracteres morfológicos, fisiológicos y marcadores AFLP. Algunos representarían eventos únicos de recombinación de gran utilidad para los mejoradores.

Caracterización genética de razas cultivadas

La clasificación de las variedades cultivadas en razas dentro de cada acervo génico inicialmente se propuso en base a caracteres morfológicos (Evans, 1973; Singh, 1991) y comportamiento en diferentes cruzas (Singh y Gutiérrez, 1984; Gepts y Bliss, 1985; Nienhuis y Singh, 1986). Luego estas razas se caracterizaron sobre la base del estudio faseolinas (Gepts y Bliss, 1986; Gepts *et al.,* 1986; Koenig *et al.,* 1990) isoenzimas (Koenig y Gepts 1989; Singh *et al.*, 1991), RFLP (Khairallah *et al.*, 1992) y RAPDs (Beebe *et al*., 2000).

Dentro del acervo génico Mesoamericano se describieron tres razas (Durango, Jalisco y Mesoamérica), descubriéndose una cuarta raza que fue identificada en base a marcadores RAPDs en porotos cultivados de Guatemala (Beebe *et al.*, 2000). Esta raza se caracteriza por presentar genotipos resistentes a dos enfermedades del poroto, la mancha angular y la antracnosis, causadas por los hongos *Phaeoisariopsis griseola* (Deuteromicotina, Moniliales, Stilbaceae) y *Colletotrichum lindemuthianum* (Deuteromicotina, Melanconiales, Melanconiaceae), respectivamente. Dentro de las razas Mesoamérica y Durango se distinguieron algunas subrazas (M1, M2, D1 y D2). La subraza M1 incluye porotos de México con un hábito de crecimiento indeterminado de tipo II. La subraza M2 es más común en América Central y comprende variedades de hábito de crecimiento postrado de tipo III (Beebe *et al.*, 2000). La raza Durango presenta dos subgrupos con diferencias en

el tamaño, color y hábito de crecimiento. La subraza D1 presenta una gran variación en el color y tipo de semilla, mientras que la D2 presenta principalmente semillas pequeñas y negras, y plantas con hábito de crecimiento tipo IV (Beebe *et al.*, 2000).

En el acervo génico Andino se identificaron tres razas (Nueva Granada, Perú y Chile) en base a datos bioquímicos y morfológicos (Singh, 1991). Papa y Gepts (2003) empleando marcadores AFLP, sugirieron que la diferenciación en razas es el resultado de la acción de la selección natural y/o artificial más que el resultado de múltiples eventos de domesticación en Mesoamérica.

Además de contribuir a la caracterización de razas y subrazas de porotos cultivados, el empleo de marcadores moleculares confirmó la reducción de su diversidad genética con respecto a las variedades silvestres, como resultado del efecto fundador producido durante la domesticación del poroto común (Sonnante *et al.*, 1994; Islam *et al.*, 2004; Papa y Gepts, 2003; Chacón *et al.*, 2005).

Mapeo genómico

Los marcadores moleculares brindan información esencial para la construcción de mapas de ligamiento (Grattapaglia y Ferreira, 1996). En el poroto común se construyeron numerosos mapas de ligamiento en base a marcadores moleculares (Tabla 1.G).

El genoma del poroto común presenta un tamaño estimado de 637 Mpb o 0,66 pg/IC (Arumuganathan y Earle, 1991). Sobre la base de los resultados obtenidos mediante marcadores RFLP y la información compartida por distintos mapas de ligamiento, Freyre *et al*. (1998) construyeron un mapa consenso para el poroto común. La población seleccionada para el mapa consenso fue una población segregante que resultó de un cruzamiento de una variedad mesoamericana y una andina (BAT93 x Jalo EEP558). Los mapas involucrados incluyen los de Davis (Nodari *et al*., 1993; Freyre *et al*., 1998), Paris (Adam-Blondon *et al*., 1994), Florida

(Vallejos *et al.*, 1992) y Nebraska-Wisconsin (Jung *et al.*, 1996). El tamaño total del mapa consenso es de aproximadamente 1200 cM y la relación promedio entre distancias genéticas y físicas es de 500 Kb/cM (Gepts, 1999). El mapa posee unos 550 marcadores incluyendo RFLP, RAPD, SCAR, isoenzimas y proteínas de reserva. Considerando los marcadores de los mapas correlacionados se localizaron al menos 1000 marcadores, uno cada 1-2 cM (Freyre *et al*., 1998; Gepts, 1999).

Tabla 1.G. Poblaciones mapeadas de poroto común y los caracteres identificados.

Padres	Abrev	Caracteres	Referencia
XR235-1-1 X DIACOL Calima (BC)	XD	Resistencia a BC	Vallejos *et al.* (1992); Yu *et al.* (1998)
BAT 93 x Jalo EEP558 (F_2)		Resistencia a: MAP,	Gepts *et al.*(1993), Nodari *et*
BAT 93 x Jalo EEP558 (RI)	BJ	VMCP, BC, R *Rhizobium spp*	*al.* (1993); Freyre *et al.* (1998)
Corel x EO2 (BC)	CE	Resistencia a: BC *Ms-8, Sgou*	Adam-Blondom *et al.* (1994)
Midas x G12873 (RI)	MG	Sindrome de domesticación: *Ppd, fin, St, y, P*; número de nodos, peso de semilla y dormición	Koinange *et al.* (1996)
BAC6 x HT7719 (RI)	BH	Resistencia a: CBB, R, WM	Jung *et al.* (1996)
Dorado x XAN176 (RI)	DX	Resistencia a: ASB, VMPC, BC, R	Miklas *et al.* (1996; 2000)
PC-50 x XAN 159 (RI)	PX	Resistencia a: BC, R, WM *C, V* peso de semilla	Jung *et al.* (1997); Park *et al.* (2000; 2001)
A55 x G122 (RI)	AG	Cruzamiento Andean x Mesoamerican; C WM resistance	Johnson *et al.* (1997); Miklas *et al.* (2001)
Belneb-RR-1 x A55 (RI)	BA	Resistencia a: VMPC, BC, TH	Ariyaranthe *et al.* (1999)
Benton x NY6020-4 (RI)	B60	Resistencia a WM	Miklas *et al.* (2001)
OAC Seaforth x OAC-95-4	S95	Resistencia a BC	Tar'an *et al.* (2001)
Montcalm x FR266 (RI)	MF	Resistencia a F	Schneider *et al*. (2001)
Montcalm x California DRK82 (RI)	MC	Canning quality traits in dark red kidney beans	Posa-Macalincag *et al.* (2002)
Bunsi x Newport (RI)	BN	Resistencia a WM	Kolkman y Kelly (2003)

MAP: Mancha angular del poroto; ANT: Antracnosis; ASB: Ashy Stem Blight; VMPC: Virus del mosaico del poroto común; BC: Bacteriosis común (*Xanthomonas campestris*); F: Pudrición radical por *Fusarium* (*Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*); TH: Tizón de halo (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*); R: Roya; WB: Pudrición radical por *Rhizoctonia* (*Rhizoctonia solani*); WM: White Mold.

El desarrollo de bibliotecas genómicas en cromosomas artificiales de bacterias (BAC) es uno de los caminos para avanzar en el estudio e identificación de secuencias específicas del genoma, de las relaciones que existen entre las distancias genéticas y físicas entre los genes, y de la estructura del genoma del

poroto común (Kami y Gepts, 2000; Vanhouter y Mackenzie, 1999). Una consecuencia importante del desarrollo de estas bibliotecas será la identificación de nuevos marcadores como microsatélites o SNP (Kelly *et al.*, 2003). Un estudio preliminar de la existencia de microsatélites en el genoma del poroto permitió el mapeo de 15 SSR en el mapa consenso (Yu *et al*., 1999; 2000).

La disponibilidad de un mayor número de marcadores moleculares permitirá identificar a aquellos asociados a genes de resistencia a enfermedades, eliminando de esta manera la necesidad de realizar ensayos rutinarios para la identificación de genotipos con resistencia. Además, ésto permite identificar a los genotipos en estadíos tempranos del desarrollo y utilizar generaciones altamente segregantes, permitiendo la eliminación de los genotipos no buscados en las primeras generaciones de selección.

La base para una selección efectiva de genes de resistencia es identificar marcadores ligados a loci de resistencia raza-específica, siempre y cuando esto sea una buena estrategia, para usarlos como herramienta para la selección indirecta de caracteres. Hasta el momento los marcadores más usados en *Phaseolus* han sido los RAPD. Estos marcadores moleculares son una herramienta de importancia para incorporar genes a través de la selección asistida por marcadores (MAS). Los SCAR son marcadores derivados de sus correspondientes marcadores RAPD y también se utilizan para la selección indirecta de cultivares con resistencia a enfermedades que provocan importantes pérdidas económicas en el poroto común. Entre ellas se puede mencionar la mancha angular cuyo agente etiológico es el hongo *Phaeoisariopsis griseola*, la antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum lindemutianum*, el virus del mosaico común del poroto (BCMV), el virus del mosaico dorado del poroto (BGMV) y la roya (*Uromyces appendiculatus*) (Kelly y Miklas, 1998).

Antecedentes del cultivo de *P. vulgaris* en Argentina

El mejoramiento del poroto en la Argentina se inició en 1972, en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), departamento de Cerrillos, provincia de Salta, con la selección de líneas mejoradas a partir de la población de poroto Alubia (= tipo blanco largo). Este cultivo fue introducido en el sur de la provincia de Salta para el consumo de los inmigrantes españoles que se asentaron en la zona a principio de siglo. El objetivo de la selección fue obtener una variedad de maduración uniforme y calidad de "grano" para la exportación. Así se obtuvo en 1975 la variedad "Alubia selección Cerrillos INTA", que aún en la actualidad se sigue utilizando en la mayor área de producción de poroto del Noroeste argentino (NOA) (García Medina *et al*., 1993).

En 1984 se inició un trabajo en conjunto entre la Estación Experimental Agropecuaria INTA Cerrillos, Salta y el Centro Experimental Regional Leales, Tucumán para el mejoramiento varietal. Las metodologías de mejoramiento utilizadas fueron la introducción y la hibridación de variedades o líneas avanzadas de programas nacionales o internacionales.

La introducción de variedades o líneas mejoradas, permitió seleccionar genotipos para ser utilizados como progenitores en los programas de hibridación (García Medina *et al*., 1993).

El mayor avance local en nuevas variedades, principalmente en poroto negro, se debió a la introducción y selección de líneas provenientes de viveros del CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia) que fueron desarrolladas en ese centro o introducidas a partir de Programas Nacionales de Centroamérica (García Medina, 1997).

La selección se basa en la evaluación estandarizada de germoplasma de acuerdo a: adaptación, rendimiento, duración del ciclo, arquitectura de la planta,

ideotipo de la planta para cosecha directa, calidad culinaria y tolerancia a enfermedades fúngicas, bacterianas y virósicas en las diferentes áreas agroecológicas y en los distintos tipos comerciales.

El mejoramiento por introducción permitió desarrollar la diversificación en tipos comerciales: “negro”, “dark red kidney”, “navy bean”, ”carioca”, ”light red kidney”, ”cranberry”, a partir de líneas avanzadas del CIAT y del Programa Nacional de EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Brasil.

El mejoramiento por hibridación se aplicó en Argentina principalmente en el tipo comercial alubia o blanco grande, debido a su importancia para la producción y exportación, a su susceptibilidad a enfermedades y fundamentalmente porque en otros países no existía una historia de mejoramiento de este tipo de poroto comercial. En cuanto al poroto negro, es el que tiene mayor historia en mejoramiento en países como México, Brasil y Guatemala.

El conocimiento de la diversidad genética existente entre y dentro de los cultivares, permite al mejorador ampliar la base genética de nuevos cultivares, facilita la determinación de genes de utilidad, maximiza el uso de los recursos genéticos disponibles y facilita la conservación eficiente de los mismos (Escribano *et al*., 1998). Además, éste conocimiento es de gran utilidad al momento de aplicar técnicas de biotecnología en los programas de mejoramiento. Por ejemplo, permite reducir el número de genotipos probados para regeneración por cultivo de tejido y transformación y seleccionar los genotipos que presentan una mayor variabilidad (McClean *et al*., 1993).

Voysest *et al*. (1994) analizó la base genética de 203 variedades de poroto común desarrolladas en América Latina hasta 1993. Las clasificó, basándose en los datos de pedigree disponibles, dentro de las seis razas existentes, encontrando que la base genética de las variedades es estrecha.

Teniendo en cuenta la falta de estudios de diversidad genética a nivel molecular en variedades comerciales del Noroeste Argentino, se realizó un análisis de las diez variedades de mayor importancia de la zona por medio de la técnica de RAPD y análisis multivariado (Galván *et al.*, 2001). El patrón de bandas de ADN permitió diferenciar a todas las variedades comerciales de *Phaseolus vulgaris* estudiadas y agruparlas, en concordancia con sus datos de pedigree y los caracteres morfológicos de las semillas (Figura 1.9) (Galván, 1999; Galván *et al.*, 2001). Los valores de similitud fueron elevados (mayores al 40%) sugiriendo que la diversidad genética existente en estas variedades es baja. Los análisis de agrupamiento y ordenación permitieron asociar las variedades a los acervos génicos Andino y Mesoamericano, en concordancia con los datos de pedigree (Galván, 1999; Galván *et al.*, 2001).

Figura 1.9. Variedades de porotos comerciales del Noroeste Argentino. Arriba: variedades Mesoamericanas; abajo: variedades Andinas (Galván, 1999).

La introducción de variedades comerciales pone en peligro la supervivencia de los cultivares tradicionales y las plantas silvestres que se han cultivado o desarrollado en esas regiones desde épocas pasadas, lo que provoca una pérdida

paulatina e irreversible de la fuente de variabilidad genética nativa (Menéndez Sevillano, 2002).

La estrecha base genética de las variedades comerciales las hace más vulnerables al ataque de enfermedades, plagas y a las condiciones adversas del medio ambiente. La protección de estos cultivos mediante la aplicación de agroquímicos, además de encarecer la producción, contamina el medio ambiente. Para aumentar la producción dentro de un desarrollo agropecuario sustentable, es fundamental incorporar a los cultivares comerciales de poroto genes de resistencia utilizando la variabilidad genética contenida en las variedades primitivas y silvestres.

Las provincias de Jujuy, Salta y Tucumán representan el límite sur del centro Andino de domesticación del poroto común y albergan un gran número de variedades primitivas y silvestres de *Phaseolus vulgaris,* que contienen una proporción importante de la variabilidad genética de la especie.

Los porotos silvestres crecen en los valles húmedos de la Cordillera Oriental de Los Andes, entre los 700 y 2600 m de altitud y entre los 22° y 35°S de latitud y los 66° 30' y 63° 00' O de longitud. En los valles altos de esta misma región, donde se practica una agricultura primitiva, aún se cultiva un gran número de variedades locales tradicionales (primitivas o landraces) que se han mantenido, a través de los años, en las huertas familiares y cuyas semillas fueron parte de la dieta de los pobladores indígenas de la zona (Menéndez Sevillano, 1985; 2002).

El germoplasma nativo ha demostrado poseer características de adaptación a la heterogeneidad ecológica de la región de origen y a la diversidad de los patógenos presentes en la misma. En los materiales silvestres de otros centros de diversificación del poroto se han hallado genes que confieren resistencia a enfermedades (Schoonhover y Cardona, 1982). Considerando que hasta la fecha sólo una pequeña fracción del germoplasma silvestre ha sido estudiada en todos los

centros de diversificación y que las variedades silvestres representan una importante fuente de variabilidad, el avance en la colección y evaluación de este material probablemente conducirá a encontrar otros caracteres de importancia para el mejoramiento del poroto común (Singh, 2001).

Objetivos

Los objetivos principales de ésta tesis son:

a) Caracterizar un grupo de poblaciones silvestres y primitivas de poroto común (*P. vulgaris*) del Noroeste Argentino (NOA), utilizando marcadores bioquímicos (faseolinas) y moleculares (RAPD e ISSR).

b) Evaluar la similitud genética entre las poblaciones estudiadas empleando técnicas de agrupamientos (UPGMA y Neighbor Joining) y de ordenación (Análisis de Coordenadas Principales).

c) Analizar el patrón de distribución geográfica de la variabilidad genética observada.

d) Evaluar la eficiencia de los marcadores bioquímicos (faseolinas) y moleculares (RAPD e ISSR) para el estudio de la variabilidad de *P. vulgaris*.

e) Comparar los resultados del análisis de la similitud genética entre poblaciones basado en datos moleculares, con aquellos resultados obtenidos mediante evidencias morfológicas.

CAPÍTULO 2

Análisis de la variabilidad genética de poblaciones silvestres de *Phaseolus vulgaris*

INTRODUCCIÓN

Las poblaciones silvestres de poroto común fueron encontradas y descriptas por primera vez por Burkart (1941) hace poco más de 60 años en el sur de los Andes, y en Guatemala por MacBryde (1947). Los porotos silvestres se distribuyen en una extensa área que abarca una distancia de más de 7000 km desde Chihuahua al Norte de México hasta Córdoba en el Centro de la República Argentina (Harlan, 1992). Son plantas anuales, herbáceas y trepadoras que crecen en zonas con precipitaciones que van de los 500 a los 1800 mm anuales, entre los 500 y los 3000 msnm.

Las poblaciones andinas se clasificaron como *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* y las mesoamericanas como *Phaseolus vulgaris* var. *mexicanus* (Berglund-Brucher y Brucher 1976; Miranda, 1967).

Phaseolus vulgaris var. *mexicanus* se diferencia morfológicamente de *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* en ciertos caracteres como: pedúnculos racimosos más cortos, un mayor número de nodos florales por racimo y semillas de menor tamaño, entre otros (Tabla 2.A)(Gepts y Debouck, 1991).

Empleando marcadores moleculares se encontró que los porotos silvestres provenientes de Ecuador y norte de Perú muestran perfiles de bandas intermedios entre los Mesoamericanos y Andinos, lo que podría deberse a que ellos son el resultado de hibridaciones entre individuos provenientes de ambos centros de diversificación o, a que constituyen el ancestro de ambos (Tohme *et al*., 1996). Evidencias moleculares apoyan la hipótesis de que el acervo génico de Ecuador y norte de Perú es el más antiguo y posiblemente el ancestro común de las variedades Andina y Mesoamericana (Khairallah *et al*., 1992; Freyre *et al.*, 1996). La secuenciación de algunos genes de la familia multigénica que codifica para las

faseolinas, principal proteína de reserva de la semilla, demostró que existen segmentos de ADN con secuencias repetidas en tandem, propias de los tipos de faseolina "S" (Sanilac) de Mesoamerica y "T" (Tendergreen) de los Andes. El tipo de faseolina "I" (Inca), encontrado en porotos silvestres de Ecuador y norte de Perú, no presenta las secuencias repetidas por lo que se propuso como un tipo ancestral (Kami *et al*. 1995), o derivado de una rama ancestral extinta (Debouck, comunicación personal).

Tabla 2.A. Diferencias morfológicas entre *Phaseolus vulgars* var. *aborigineus* y *Phaseolus vulgaris* var. *mexicanus* (Gepts y Debouck, 1991).

Carácter	***P. vulgaris* var. *mexicanus***	***P. vulgaris* var. *aborigineus***
Semillas		
Largo	5-7 mm	8-10 mm
Ancho	3,5-5 mm	5-7 mm
Peso (100 semillas)	6-8 g	12-14 g
Color	gris y blanco/manchas negras y/o rayas; negro; marrón claro	idem; el color negro es muy poco frecuente
Forma	redondeada	prismática
Vainas		
Largo	6-7 cm	7-8 cm
Ancho	0,6-0,8 cm	0,8-1,0 cm
N° de semillas/vaina	6-8	5-7
Flores		
Color	Lavanda, rosado, raramente blanca	Lavanda
Forma de bracteola	Grande (hasta 8 mm), ovalada	Pequeña (hasta 5 mm), triangular
Hojas		
Largo	8-16 cm	5-13 cm
Ancho	6-11 cm	3-8 cm

El hábitat y sitio de origen de *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* son los valles húmedos de la Cordillera Oriental de los Andes, entre los 700 y 3000 m de altitud, los 22° y 35° de latitud Sur, y los 66° 30' y 63° 00' de longitud Oeste.

La topografía de Los Andes en Perú, Bolivia y Argentina genera una diversidad de ambientes que favorecen el aislamiento reproductivo, debido a ésto es probable que la variabilidad existente en los porotos silvestres de origen andino

refleje una mayor estructuración geográfica que la observada en poblaciones de porotos silvestres mesoamericanos (Tohme *et al*., 1996).

Sistema reproductivo

El sistema primitivo de reproducción en plantas superiores es la fecundación cruzada, el cual predomina en las Angiospermas y se observa también en las Gimnospermas. Un estudio realizado en 1500 especies reveló que un 62% de las plantas superiores son alógamas, un 17% son autógamas y un 9% apomícticas. De las restantes, el 10% son parcialmente alógamas y el 2% comparte sexualidad y asexualidad (Cubero, 1999). Los límites entre los sistemas básicos de reproducción en plantas (alogamia, autogamia, propagación vegetativa, etc.) no son rígidos ya que el sistema reproductivo es el carácter adaptativo por excelencia, que le permite a la planta sobrevivir en distintos ambientes y dejar descendientes.

A pesar de la supuesta autogamia estricta de *Phaseolus vulgaris*, hay evidencias que documentan la existencia de una gran variabilidad en el sistema reproductivo de esta especie, tanto en variedades cultivadas como silvestres (Wells *et al*., 1988; Ibarra-Pérez *et al.*, 1997; Triana *et al*., 1993). Asimismo este sistema reproductivo probablemente se ve afectado por las condiciones ecológicas en que se desarrollan estas variedades (Santalla *et al.*, 2003; Hoc y García, 1999; Hoc *et al.*, 2001). En un estudio realizado con poblaciones de porotos silvestres de Colombia, en un campo de cultivo experimental, la tasa de fecundación cruzada reveló un promedio de 1,5%, con un rango de 0,07 a 8,62% (Triana *et al*., 1993).

Hoc y García (1999) realizaron estudios de la biología floral y el sistema reproductivo de poblaciones de *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* de la Quebrada del Toro (Salta, Argentina) y determinaron que la antesis dura entre 9-13 horas, que las flores presentan protoginia (el estigma se encuentra receptivo en los capullos,

cuando las anteras no están dehiscentes) y estarían adaptadas a la polinización por himenópteros de tamaño mediano (Figura 2.1). Dichos autores señalan que la protoginia favorecería la fecundación cruzada cuando anctúan estos polinizadores y en estas condiciones el éxito reproductivo de la variedad aumentaría, sugiriendo un mecanismo incipiente de autoincompatibilidad. Sin embargo, Hoc y García (1999) destacan que los resultados de sus investigaciones son preliminares para determinar el sistema reproductivo de la variedad estudiada, pues la tasa de fecundación cruzada no fue medida. Por lo tanto, en el presente trabajo de tesis se asume que las poblaciones son preferentemente autógamas con un reducido grado de alogamia.

Figura 2.1. Flor de *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus*

Análisis de la variabilidad genética

Gepts (1990) demostró que la faseolina, principal proteína de reserva de las semillas, es un marcador útil para los estudios evolutivos en *P. vulgaris.* La faseolina es una proteína oligomérica compuesta por tres unidades polipeptídicas de entre 43 y 54 KD y se encuentra codificada por un loci complejo de 6 a 9 genes (Brown *et al.,* 1981) (Ver Anexo 3, página 180). Se identificaron mas de 40 patrones de faseolina, (Gepts *et al.*, 1986; Koenig *et al.*, 1990) según los cultivares donde fueron observados inicialmente, predominando los tipos "S" y "T" en cultivares Mesoamericanos y los tipos "T", "H" y "C" en cultivares Andinos, que corresponden a los cultivares "Sanilac" (S), "Tendergreen" (T), "Huevo de Guanchaco" (H) y "Contender" (C), repectivamente. El tipo de faseolina "B", del cultivar "Bolon Bayo", sólo se observó en porotos silvestres y domesticados de Colombia, y el tipo de faseolina "I" ("Inca") sólo en posotros silvestres de Ecuador y norte de Perú.

Estudios realizados por Gepts (1990) y Sonnante *et al*. (1994) demostraron la existencia de una correspondencia entre los tipos de faseolina de los porotos silvestres y cultivados y su distribución geográfica, debido principalmente a la ocurrencia de múltiples sitios de domesticación. Las poblaciones silvestres mostraron patrones de faseolinas únicos, como el "M" y "Ch" (de "Middle America" y "Chihuahua"), ausentes en los porotos domesticados, lo que sería atribuible al proceso de domesticación que tuvo lugar a partir de pocos individuos de algunas poblaciones de porotos silvestres (Gepts *et al*., 1986). Posteriormente, la introducción de porotos cultivados por el intercambio entre las regiones y los cruzamientos ocasionales habrian dado origen a tipos recombinantes como el "C" y el "A", este último del cultivar "Ayacucho" (Tabla 2.B).

Tabla 2.B. Tipos de faseolinas más frecuentes encontrados en los porotos silvestres y cultivados.

Región	Tipo de Faseolina	
	Silvestres	Cultivados
Mesoamérica	"S", "M"	"S", "T"
Colombia	"B", "Ch"	"S", "T", "C", "B"
Andes	"T", "H", "C"	"T", "H", "C", "A"
Ecuador y norte de Perú	"I"	

Estudios posteriores emplearon marcadores del ADN para el análisis de la diversidad genética de las poblaciones silvestres, como por ejemplo RFLP (Khairallah *et al.*, 1992; Becerra-Velásquez y Gepts, 1994), RAPD (Cattan-Toupance *et al.*, 1998), AFLP (Beebe *et al.*, 2001; Papa y Gepts, 2003) y RFLP-PCR (Chacón *et al.*, 2005). Estas técnicas mostraron que la diversidad genética existente en las poblaciones de porotos silvestres de la región andina es menor que la de las poblaciones mesoamericanas. Más aún, mediante el análisis de poblaciones silvestres andinas con marcadores AFLP, Beebe *et al*. (2001) sugirieron que la zona este de Bolivia sería una zona de domesticación primaria del acervo génico andino, ya que mediante el análisis de agrupamientos (=clusters) se observó una elevada similitud entre las poblaciones silvestres y domesticadas de esa región. Estudios recientes realizados en base al análisis de secuencias de ADN de cloroplastos de porotos silvestres y primitivos apoyan la idea de eventos de domesticación independientes en Mesoamérica y la región Andina, y además sugieren la ocurrencia de un único evento de domesticación para los porotos Andinos que habría tenido lugar a partir de una población silvestre de la zona del sur de Perú, Bolivia o Argentina (Chacón *et al.*, 2005).

El germoplasma silvestre es de gran importancia para el mejoramiento del poroto domesticado ya que los híbridos que se obtienen con los cultivares

comerciales son fértiles (Cattan-Toupance *et al*., 1998; Singh, 2001). Los cultivares silvestres constituyen una fuente potencial de variabilidad genética, lo que se demuestra, por ejemplo, con la presencia de la arcelina, proteína de reserva de la semilla de porotos silvestres que le confiere resistencia al ataque del gorgojo de Centro América, *Zabrotes subfaciatus* (Coleoptera: Bruchidae). Mientras que los porotos silvestres mostraron esa resistencia, las poblaciones de porotos domesticados de México fueron susceptibles (Schoonhover y Cardona, 1982). Los estudios de porotos andinos de germoplasma silvestre y domesticado contribuyen a identificar fuentes de diversidad que permitirían ampliar la base genética de los cultivares andinos, cuyo potencial de rendimiento es muy difícil de mejorar (White *et al.*, 1992).

Actualmente se dispone de un número apreciable de entradas de porotos silvestres provenientes de diferentes acervos génicos (Menéndez Sevillano, 2002). El análisis de la diversidad genética en las poblaciones silvestres aportará información indispensable para realizar un uso racional de los recursos genéticos disponibles en los nuevos programas de mejoramiento que tienden a ampliar la base genética de nuevos cultivares.

El objetivo de este capítulo es analizar la variabilidad genética existente en nueve muestras poblacionales de porotos silvestres (*Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus*) del Noroeste Argentino, recolectadas en diferentes sitios de las provincias fitogeográficas de las Yungas, Prepuna y Chaqueña, a diferentes alturas. Se emplearon para ello marcadores bioquímicos (Faseolinas) y moleculares (RAPD e ISSR), cuyos resultados se analizaron mediante tres técnicas (UPGMA, Análisis de Coordenadas Principales y Neighbor Joining).

Las preguntas a responder en éste capítulo son las siguientes:

- ¿Existe estructuración geográfica de la variabilidad genética de las poblaciones o grupos de poblaciones?
- ¿Cuál es la eficiencia de los diferentes marcadores genéticos utilizados para caracterizar las poblaciones de porotos silvestres del NOA?
- ¿Hay congruencia entre los resultados de los agrupamientos de las muestras poblacionales basados en datos morfológicos y en estudios moleculares?

Material biológico

Se trabajó con un total de 27 individuos de distintas poblaciones de porotos silvestres (*Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus*) provenientes de la colección del Banco de germoplasma del Laboratorio de Recursos Fitogenéticos "N. I. Vavilov" de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

Las muestras de porotos silvestres incluyeron materiales recolectados en seis localidades de las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy (Tabla 2.C). Las recolecciones fueron realizadas en sitios localizados entre los 22° y 28° de latitud Sur, y los 64° y 66° de longitud Oeste, a una altitud que osciló entre los 1300 y 2600 msnm (Figura 2.2).

Figura 2.2. Sitios donde fueron recolectadas las muestras de porotos silvestres analizadas.

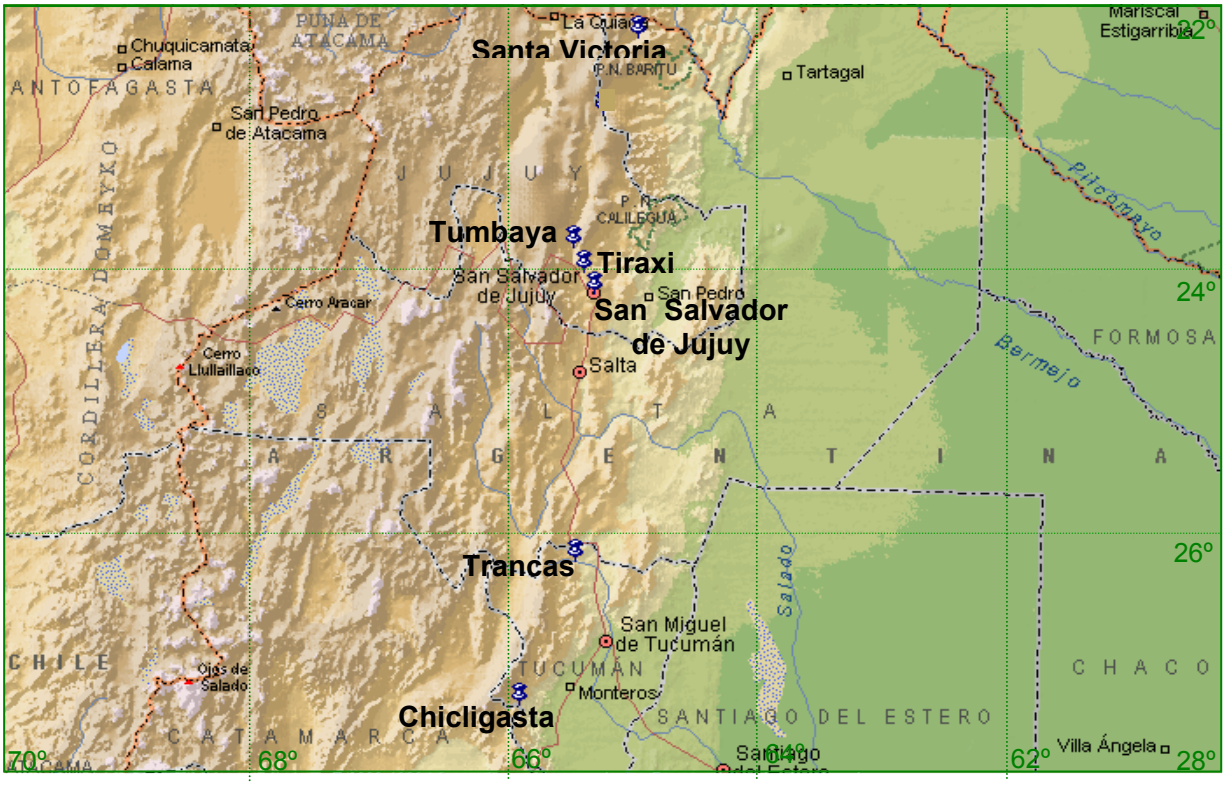


Tabla 2.C. Sitios de recolección de las muestras de porotos silvestres (*Phaseolus vulgaris* var. *aborigeneus*) analizadas.

Nomenclatura	Código de entrada	Provincia	Localidad o dpto.	Prov. Fitog.*	Distrito Fitog.	Altitud msnm	Latitud S	Longitud O
S1	VAV-6364	Salta	Santa Victoria	Y	Pastizal de neblina	2300	22° 15’	64° 58’
S2	VAV-6365	Salta	Santa Victoria	Y	Pastizal de neblina	2600	22° 15’	64° 58’
J1	VAV-6362	Jujuy	Tumbaya	P	Prepuna	1900	23° 50’	65° 28’
J2	VAV-6363	Jujuy	Tiraxi	Y	Selva Montana	1600	24° 02’	65° 23’
J3	VAV-6366	Jujuy	S. S. de Jujuy	Ch	Chaco Serrano	1500	24° 11’	65° 18’
T1	VAV-6368	Tucumán	Trancas (dpto.)	Ch	Chaco semiárido, intermontano	1300	26° 13’	65° 27’
T2	VAV-6369	Tucumán	Trancas (dpto.)	Ch	Chaco semiárido, intermontano	1500	26° 13’	65° 27’
T3	VAV-6370	Tucumán	Trancas (dpto.)	Ch	Chaco semiárido, intermontano	1500	26° 13’	65° 27’
T4	MCM-146	Tucumán	Chicligasta (dpto.)	Y	Selva Montana	1600	27° 18’	65° 55’

*Provincia Fitogeográfica: Ch: Provincia Chaqueña; P, Provincia de la Prepuna; Y, Provincia de las Yungas.

La sigla VAV identifica el material del Laboratorio de Recursos Fitogenéticos “N. I. Vavilov” de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Buenos Aires. La sigla MCM identifica al recolector, María del Carmen Menéndez Sevillano. Cada entrada corresponde al material recolectado en los distintos sitios y se reconoce por un código. En el presente trabajo se consideró a cada entrada o accesión como una muestra poblacional y se empleó la nomenclatura de las muestras por provincia de origen, ya que corresponden a latitudes y altitudes diferentes (Figura 2.3).

Las zonas de recolección comprendieron tres provincias fitogeográficas, la provincia de Las Yungas del Dominio Amazónico y las provincias Chaqueña y de la Prepuna del Dominio Chaqueño, con zonas de diferente altitud dentro de cada

provincia. La provincia de **Las Yungas** presenta un clima cálido y húmedo, con lluvias estivales que alcanzan los 2500 mm anuales y heladas en el invierno. Ésta provincia tiene una geografía conformada por montañas, quebradas y llanuras onduladas con suelos ácidos y microclimas. El clima húmedo se debe no sólo a las abundantes precipitaciones, sino en especial a las neblinas que cubren casi continuamente las montañas. Altitudinalmente la provincia de las Yungas se extiende entre los 500 y los 2500 a 3000 m de altitud, según las diferentes latitudes. La provincia **Chaqueña** abarca llanuras y sierras de poca alevación, entre los 300 y 1800 m de altitud, de clima continental y lluvias estivales que varían desde 500 mm en el oeste, hasta 1200 mm anuales en el extremo este. La temperatura media anual es de 20 a 23ºC. La zona occidental sólo tiene lluvias en verano (de noviembre a marzo), mientras que en la oriental llueve casi todos los meses del año. (Figura 2.4). La provincia de la **Prepuna** abarca las quebradas y laderas secas del noroeste, entre los 1500 y los 3500 msnm. La pertenencia a esta provincia fitogeográfica depende de la disposición y orientación de las montañas, bajo un clima seco y cálido, con lluvias exclusivamente estivales. La vegetación es predominantemente arbustiva, baja y esparcida, mezclada con cardones (Cabrera y Willink, 1980) (Tabla 2. D).

Tabla 2.D. Condiciones topográficas y climáticas de las zonas fitogeográficas donde fueron recolectadas las muestras de porotos silvestres (Cabrera, 1971).

Provincia fitogeográfica	Altura (msnm)	Tº anual promedio	Precipitación anual promedio	Período de lluvia
Yungas	500-2500	14ºC-16ºC	900-2500 mm	Estivales
Chaco	300- 1800	20ºC-23ºC	500-1200 mm	Estivales
Prepuna	1500-3500	9ºC-11ºC	150-200 mm	Estivales

Figura 2.3. Muestras poblacionales de porotos silvestres (*Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus*) del Noroeste Argentino. S1: VAV-6364, S2: VAV-6365, J1: VAV-6362, J2: VAV-6363, J3: VAV-6366, T1: VAV-6368, T2: VAV-6369, T3: VAV-6370, T4: MCM-146.

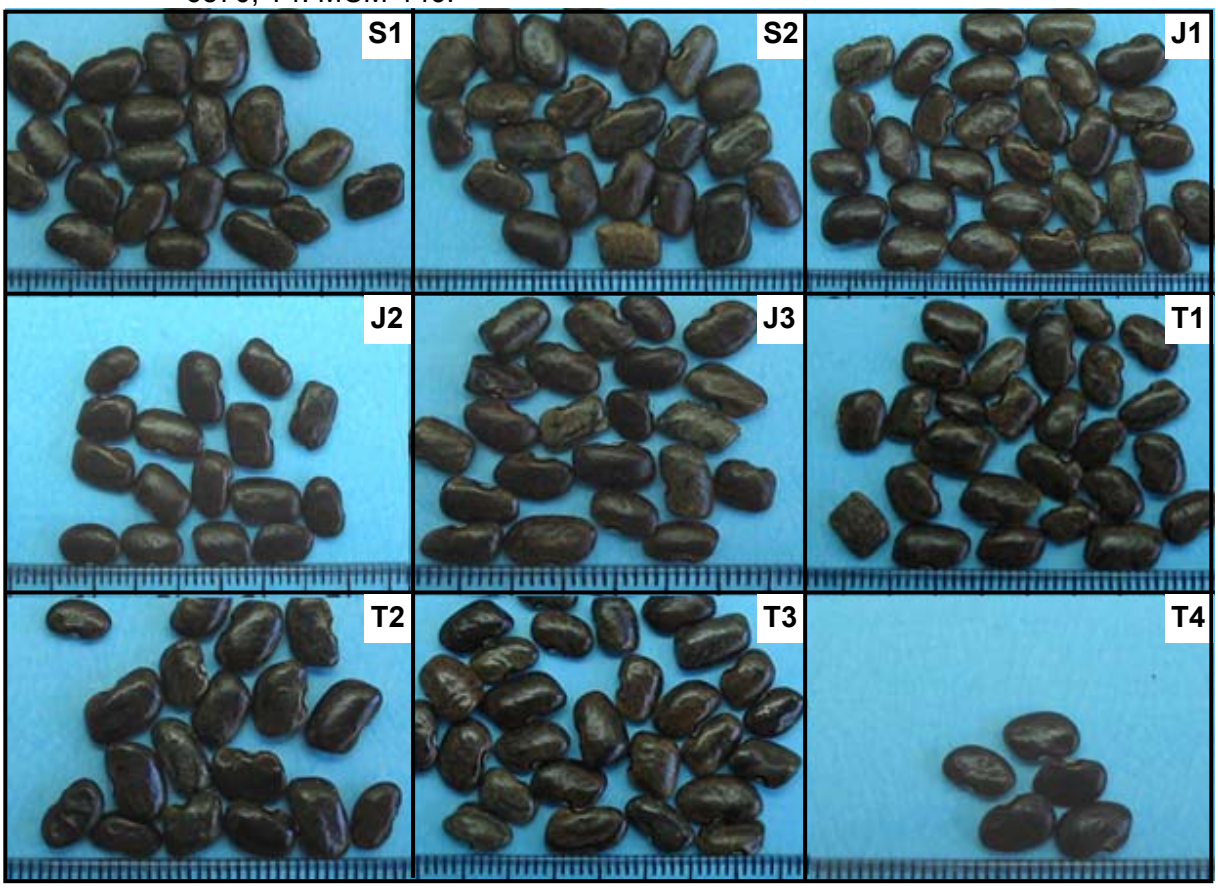


Figura 2.4. Vegetación de Tiraxi, una de las localidades donde fueron recolectadas las muestras de porotos silvestres analizadas. Se observa el hábito trepador del poroto silvestre.

Marcadores bioquímicos. Faseolinas

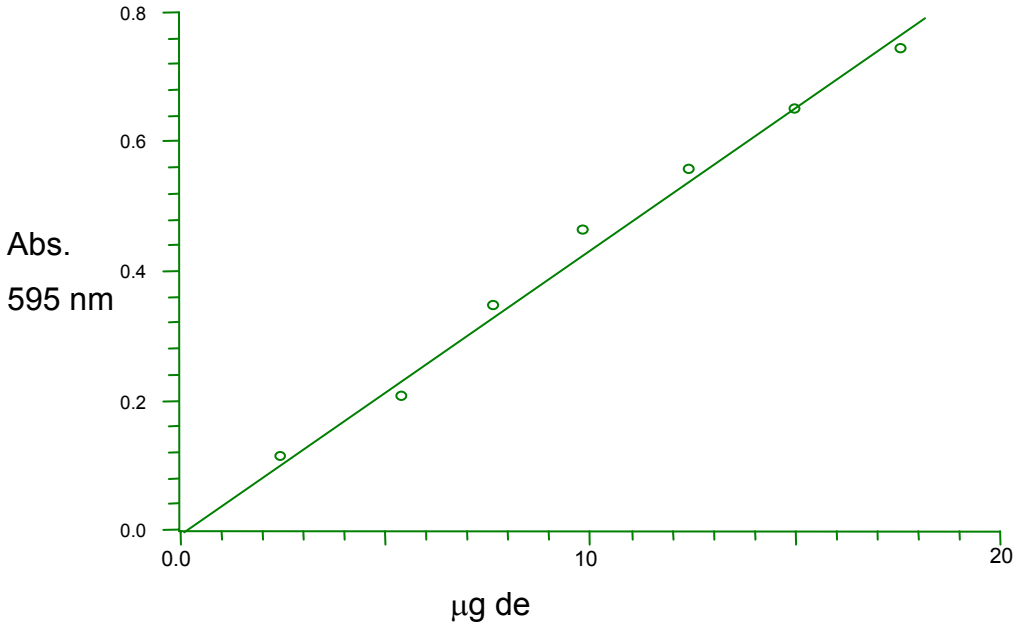
Extracción de faseolinas

El análisis de faseolinas se realizó de acuerdo con el protocolo descripto por Brown *et al.* (1981). Se analizaron cinco individuos de cada muestra poblacional. Con un bisturí se removió la cubierta seminal, se tomó una muestra de 30 mg de cotiledón de cada semilla, se molió en mortero y el material triturado se colocó en tubos Eppendorf. A cada tubo se le agregó 400µl de NaCl pH 2,4, se lo agitó en vórtex y se lo centrifugó durante 10 min a 14.300 rpm. La fase acuosa de cada uno de los tubos se transfirió a otro tubo y se adicionó 1 volumen de cracking buffer (0,625 M Tris-HCl pH 6,8; 2mM EDTA; 2% p/v SDS; 40% p/v sacarosa; 1% p/v 2-βmercaptoetanol; 0,01% p/v azul bromofenol). Las muestras se incubaron a 100°C durante 5 min y se conservaron a -20°C.

Cuantificación

La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford (1976). Se generó una curva standard de calibración con diluciones de albúmina de suero bovino (BSA) de concentración conocida. Se tomó una alícuota de 100µl de cada dilución y se agregó a cada tubo 1 ml de reactivo de Bradford [1 vol de solución stock (0,2 % Comassie blue en etanol); 2 vol de ácido fosfórico 85% p/v y 20 vol de agua]. La reacción se evaluó por espectrofotometría a 595 nm, determinándose la absorbancia. Una vez obtenida la curva de calibración se procedió de la misma manera con una alícuota de 100µl del extracto de proteínas, se determinó la absorbancia de las muestras y se calculó la cantidad de proteína en base a la curva de calibración (Figura 2.5).

Figura 2.5. Curva de calibración del método de Bradford (Abs.: Absorbancia).



Visualización de bandas

Los patrones proteicos se determinaron por SDS/PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis) según Laemmli (1970). El gel de stacking consistió en: 4% p/v de acrilamida en 0,5 M de Tris-HCl pH 6,8 con 10% p/v de SDS, 1‰ p/v persulfato de amonio y 0,26‰ TEMED. El gel separador consistió en: 15% p/v de acrilamida en 1,5 M de Tris-HCl pH 8,8 con 10% p/v; de SDS, 1‰ p/v persulfato de amonio y 0,45‰ TEMED. El buffer de corrida consistió en: 0,0025 M Tris, 0,192 M glicina y 1% de SDS, pH 8,3.

Las muestras se corrieron por 8 hs a 40 mA en una cuba BioRad Protean II, con una fuente de poder EPS 300 (Pharmacia Biotech). Los geles se tiñeron con una solución de 50% de metanol, 10% de ácido acético y 1‰ p/v Coomasie blue

durante 12 hs y se decoloró con una solución de 20% de metanol y 7% de ácido acético glacial.

En cada gel se incluyeron como patrones los cultivares Alubia y NAG12 de origen Andino y Mesoamericano, respectivamente. Además se incluyó un marcador de peso molecular (LMW Calibration Protein Standards of Pharmacia).

Marcadores moleculares

Cultivo de plántulas

Quince semillas de cada muestra se esterilizaron superficialmente, sumergiéndolas en etanol 50% por 3 minutos y en hipoclorito de sodio 50% también por 3 minutos y se lavaron con agua, se pregerminaron en agar agua 1% a 28°C durante 48 h y se transplantaron a bandejas plásticas de 15 x 25 cm, con vermiculita como medio de sostén. Las plantas se mantuvieron en cámara de crecimiento durante 4 días a 28ºC.

Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó empleando el protocolo de Doyle y Doyle (1990) modificado por Bornet y Branchard (2001). Aunque se obtuvo ADN de 10 individuos por muestra poblacional por motivos estrictamente económicos (crisis año 2001) sólo se analizaron 3 por muestra poblacional.

Trescientos miligramos de tejido foliar se molieron en presencia de 1 ml de solución de CTAB (100 mM TrisHCl, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 0.2 % βmercaptoethanol, 2 % CTAB) y se incubó en un tubo Eppendorf a 60°C durante 30 min. Luego se adicionaron 600 µl de una solución de cloroformo/isoamil alcohol (12:1), se agitó en vórtex y se centrifugó 5 min a 14.300 rpm. La fase acuosa se transfirió a otro tubo con el fin de precipitar el ADN y se adicionaron 600 µl de

isopropanol frío incubándose la mezcla a -20°C durante toda la noche. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 8 min a 14.300 rpm, se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó con 300 μl de una solución de 75 % etanol /10mM acetato de amonio. Se centrifugó 3 min a 14.300 rpm., se descartó el etanol y el ADN precipitado se secó para luego resuspenderlo en 50μl de buffer TE (10mM TrisHCl, 1mM EDTA). Finalmente se adicionó 2μl de RNAsa (10μg/μl; Sigma) incubándose 30 min a 37°C.

La cantidad y calidad del ADN extraído se estimaron en un gel de agarosa 0,7% con bromuro de etidio (Sambrook *et al*., 1989), utilizando como standard interno el marcador molecular 1Kb DNA Step Ladder (Promega Corporation).

Reacciones de amplificación del ADN por PCR.

- Técnica de RAPD

1. Selección de “primers”

Se utilizaron 34 “primers” de 10 bases con secuencias similares a la serie de Operon Technologies Alameda, USA, que fueron sintetizados por el laboratorio DNAgency (Malvern, USA). La secuencia de nucleótidos de cada “primer" se muestra en la Tabla 2.E.

2. Condiciones de amplificación

La amplificación del ADN se realizó en un volumen de 15 μl, conteniendo 15-20 ng de ADN genómico, buffer de reacción 10X (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT (Dithiothreitol), 50% Glicerol y 0,5 % Tween®20, 0,5% Nonidet® P40.), BSA 5X (albúmina de suero bovino), 0,4 μM de “primer” (DNAgency, USA), 200 μM de cada dNTP, 1,5 mM Cl_2Mg, 0,5 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Promega Corporation). A cada tubo de reacción se le adicionaron

20 μl de aceite mineral para evitar que la evaporación de agua provoque variaciones en la concentración de sales. En cada reacción de amplificación se analizaron tres individuos de cada muestra, incluyéndose un control negativo sin ADN. Además se realizaron dos repeticiones de cada reacción.

Tabla 2.E. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para el análisis de la diversidad genética entre las muestras de *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus*.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Nombre	Secuencia (5'-3')
OPA 02	tgccgagctg	**Oligo P 124**	attgcgtccgag
OPA 05	aggggtcttg	**A 08**	acgcacaacc
OPA 07	gaaacgggtg	**OPA 14**	tctgtgctgg
OPA 09	gggtaacgcc	**OPB 10**	ctgctgggac
OPA 10	gtgatcgcag	**OPB 15**	ggagggtgtt
OPA 13	cagcacccac	**OPC 04**	ccgcatctac
OPA 20	gttgcgatcc	**OPC 11**	aaagctgcgg
OPC 19	gttgccagcc	**OPC 20**	acttcgccac
OPE 08	tcaccacggt	**OPF 10**	ggaagcttgg
OPE 15	acgcacaacc	**OPG 03**	gagccctcca
OPE 16	ggtgactgtg	**OPG 05**	ctgagacgga
OPE 19	acggcgtatg	**OPJ 13**	ccacactacc
OPE 20	aacggtgacc	**OPR 04**	cccgtagcac
OPE 18	aggtgaccgt	**OPW 13**	cacagcgaca
H 03	agacgtccac	**OPA 18**	aggtgaccgt
B 08	tcaccagggt	**OPA 06**	ggtccctgac
H 04	ggaagtcgcc	**OPA 19**	caaacgtcgg

El termociclador (Thermolyne Temp-Tronic®) se programó con una secuencia de ciclos consistentes en: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min y 45 ciclos de desnaturalización a 94°C (45 seg), apareamiento o "annealing" a 36°C (1 min), extensión a 72°C (1 min) y extensión final a 72°C (7 min).

- Técnica de ISSR

1. Selección de "primers"

Se utilizaron 10 "primers" con secuencias de entre 15 y 18 bases, de di y tri-nucleótidos repetidas en tandem, que fueron sintetizados por el laboratorio DNAgency (Malvern, USA). En estudios previos estos "primers" permitieron

identificar polimorfismos entre 10 cultivares de porotos del NOA (Galván *et al.*, 2003).

La secuencia de nucleótidos de cada "primer" se presenta en la Tabla 2.F.

Tabla 2.F. Secuencia de los "primers" ISSR utilizados para el análisis de polimorfismo entre los porotos silvestres y temperatura de annealing.

Primer	Secuencia (5'-3')	T° annealing (°C)
A	$(AC)_8$	57
B	$(AG)_8TG$	52
C	$(AG)_8CG$	54
D	$(AG)_8$	49
E	$CTC(GT)_8$	54
F	$CT(GA)_8$	57
G	$GAG(CAA)_5$	52
H	$(GCC)_5$	66
I	$(CCA)_5$	55
J	$(CAC)_5$	55

2. Condiciones de amplificación

Las condiciones de amplificación se optimizaron evaluando diferentes concentraciones de ADN y de "primer", variando además la temperatura y tiempo de annealing. Finalmente, las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 μl, conteniendo 12 ng de ADN genómico, buffer de reacción 10X (750 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 (NH_4SO_4, 0,1% (v/v) Tween 20), 1,25 unidades de *T-plus* ADN polymerasa (Highway Molecular Biology- InBio- UNICEN- Tandil), 0,7 μM de "primer" (DNAgency, USA), 200 μM de cada dNTP y 2,5 mM de Cl_2Mg. A cada tubo de reacción se le adicionó una alícuota de 20 μl de aceite mineral. En cada reacción de amplificación se analizaron independientemente tres individuos de cada muestra y se incluyó un control negativo sin ADN.

El termociclador (PTC-100™ Programmable Thermal Controller-M.J.Research, INC.) se programó con una secuencia de ciclos consistentes en:

desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min y 33 ciclos de desnaturalización a 94°C (1 min), apareamiento o "annealing" a temperaturas entre 49 y 66°C según el "primer" (1 min 15 seg), extensión a 72°C (4 min) y extensión final a 72°C (7 min).

Visualización de los fragmentos amplificados

Los fragmentos de ADN amplificados se separaron en base al tamaño por electroforesis submarina en geles de agarosa 2%, conteniendo 2% de Bromuro de Etidio (10μg/ml) en buffer TBE 1X. Las corridas electroforéticas se realizaron a una corriente de 100 voltios durante 3 horas. En cada gel se sembró un marcador de peso molecular para poder estimar posteriormente el tamaño de los fragmentos de ADN.

Las bandas de ADN se observaron colocando los geles en un transiluminador de luz U.V. Los geles se documentaron utilizando una cámara Polaroid GelCam con película Polaroid en blanco y negro de alta sensibilidad (tipo 667).

Determinación del tamaño de los fragmentos de ADN

Las moléculas de ADN migran en el gel de agarosa a una velocidad inversamente proporcional al $\log_{10}$ del número de pares de bases que conforman la molécula (Sambrook *et al*., 1989). Para determinar el tamaño de los fragmentos se utilizó un marcador de peso molecular el 1 Kb DNA Ladder (Promega Corporation) que incluye un total de 13 bandas, entre 250 pb (pares de bases) y 10.000 pb. A partir de la migración de las bandas del marcador, se construyó en un papel semilogarítmico una curva en función del tamaño del ADN (en pares de bases) en el eje de las ordenadas y la distancia de migración (en cm) en el eje de abscisas, que permitió determinar el tamaño de los fragmentos amplificados.

Análisis de datos

Análisis de agrupamientos y de Coordenadas Principales.

Para el análisis de los datos se generó una matriz binaria, a partir de los documentos fotográficos de los fragmentos de ADN amplificados y separados por electroforesis. Esta es una matriz **n** x **t** donde las **n** filas representan las bandas RAPD (caracteres o variables) y las **t** columnas representan los genotipos (OTU-Unidades Taxonómicas Operativas) (Sneath y Sokal, 1973).

Para cada "primer" se consideró presencia (1) o ausencia (0) de bandas.

La similitud entre los genotipos se cuantificó aplicando dos coeficientes de asociación que miden las coincidencias y diferencias entre los estados de los caracteres de ambos genotipos (Legendre y Legendre, 1983).

Se utilizó un coeficiente simétrico, el coeficiente Simple Matching y un coeficiente asimétrico, el coeficiente de asociación de Jaccard, según los definieron Sneath y Sokal (1973). Los coeficientes simétricos utilizan la doble ausencia o doble cero para el cálculo de la matriz de similitud, mientras que para los coeficientes asimétricos la doble ausencia no es indicativa de semejanza. El coeficiente de Simple Matching (SM) se expresa por la fórmula: $Sij = (a+d)/(a+b+c+d)$; y el coeficiente de Jaccard (J) por la fórmula: $Sij = a/(a+b+c+d)$, donde *Sij* es la similitud entre dos individuos, i y j; *a* es el número de bandas presentes en ambos i y j; *b* es el número de bandas presentes en i y ausentes en j; *c* es el número de bandas presentes en j y ausentes en i, y *d* es el número de bandas ausentes en ambos.

Los valores de similitud de los coeficientes oscilan entre 1 y 0, que equivalen a la máxima y mínima similitud, respectivamente.

El análisis de la matriz de similitud se realizó con la técnica de **UPGMA** (unweighted pair-group method using arithmetic averages) y se generó un fenograma para cada uno de los coeficientes de asociación utilizados.

La técnica de UPGMA es una técnica aglomerativa que, partiendo de n OTUs los agrupa en sucesivos conjuntos (de número menor que n) para llegar finalmente a un solo conjunto que contiene las n unidades. Esta técnica es jerárquica porque origina conjuntos que presentan rangos, exclusiva porque los genotipos no pueden pertenecer a más de un grupo en un mismo nivel o rango y secuencial porque los grupos se forman de a uno hasta agotar el conjunto total (Crisci y López Armengol, 1983).

En cada etapa del proceso de agrupamiento se obtiene una matriz derivada y los valores que constituyen dicha matriz dependen de la técnica de agrupamiento utilizada. En el caso de la técnica de UPGMA se considera que el valor de similitud de la unidad a incorporarse a un grupo o núcleo es igual al promedio de los valores de similitud entre la unidad y cada uno de los integrantes del núcleo, retornando en cada paso a la matriz de similitud original (Crisci y López Armengol, 1983).

Para medir el grado en que los fenogramas representan los valores de la matriz de similitud, se aplicó el coeficiente de correlación cofenética (CCC). Se construyó una nueva matriz de similitud a partir de los valores del fenograma denominada matriz cofenética y se calculó la correlación existente entre los valores de dicha matriz y los de la matriz de similitud original. Generalmente los valores obtenidos oscilan entre 0,6 y 0,95, de modo que valores superiores a 0,8 indican una escasa distorsión o una buena representación de la matriz de similitud por parte del fenograma (Sneath y Sokal, 1973).

También se aplicó la técnica de **Neighbor Joining** (NJ) (Saitou y Nei, 1987) a partir de la matriz de similitud de Jaccard. En el algoritmo de Neighbor Joining

(vecino más próximo) las unidades de estudio (OTUs) se conectan con aquéllas más cercanas, de manera tal que se minimiza la longitud total del árbol (Pearson *et al.*, 1999). Los árboles de NJ se representan generalmente como "networks" (redes) o árboles sin raíz.

La técnica de construcción de un árbol de NJ es similar a la que se utiliza para construir fenogramas, ya que se seleccionan primero las unidades de estudio cuya distancia genética es mínima y luego se van incorporando secuencialmente las restantes, siempre de acuerdo con sus mínimas distancias. La diferencia fundamental con los fenogramas, es que para obtener el árbol definitivo se realizan una serie de rearreglos o cambios de las relaciones entre las OTU con respecto a la topología inicial. El mejor rearreglo será el que produce el mejor ajuste entre la matríz de distancia derivada del árbol y la matríz de distancia original (Lanteri *et al.*, 2005).

Para cuantificar el grado de apoyo de los clusters en los árboles de Neighbor Joining se utilizó la medida de "bootstrap", propuesta por Felsenstein (1988). El procedimiento consiste en realizar un remuestreo con reposición de los caracteres de la matriz de datos (bandas polimórficas) para obtener una matriz del mismo tamaño que la original (matriz remuestreada o pseudorréplica). El proceso se realiza gran cantidad de veces (por ejemplo 1000), de modo que en cada pseudorréplica algunos caracteres pueden estar repetidos y otros faltan. Por cada matriz remuestreada se calcula un "network" y el grado de conflicto entre los mismos se estima mediante un árbol de consenso de mayoría, que incluirá todos los grupos que estén soportados en más del 50% de las pseudorréplicas (Felsenstein, 1988). El porcentaje de veces que aparecen dichos grupos en todos los árboles comparados, se interpreta como una medida estadística del soporte de los mismos (Lanteri *et al.*, 2005).

Como método de ordenación se utilizó el **Análisis de Coordenadas Principales** (Gower, 1966). Este análisis sitúa a los individuos en un espacio factorial reducido, preservando entre ellos las relaciones de distancia descriptas por la medida de similitud. La representación de estos objetos dentro del espacio de las primeras coordenadas principales es la mejor aproximación posible de estas distancias dentro del espacio reducido (Legendre y Legendre, 1983). En términos generales la técnica se basa en la representación gráfica de los genotipos en un espacio multidimensional donde todos los caracteres contribuyen de manera diferencial a todos los ejes.

Para llevar a cabo el Análisis de Coordenadas Principales y generar los fenogramas por UPGMA se utilizó el programa NTSYS-pc 2.02 (Rohlf, 1998) y para obtener el árbol de Neighbour Joining se emplearon los programas RAPDPLOT (Black, 1998), QBPLOT4 (Culasso, 2005) y PHYLIP3.6 (Phylogeny Inference Package) (Felsenstein, 2005).

La correlación entre las matrices de similitud (Simple Matching y Jaccard), las alturas y las distancias geográficas entre los sitios de recolección de las muestras poblacionales se determinó aplicando el test estadístico de Mantel (Mantel, 1967), utilizando la función MXCOMP del programa NTSYS-pc 2.02 (Rohlf, 1998).

Análisis de la varianza molecular.

El análisis de varianza molecular, AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992) se empleó para particionar la varianza en sus componentes jerárquicos y para probar la significancia de los mismos. En este caso se analizó la variabilidad entre individuos de diferentes provincias y dentro de provincias (Jujuy: 9 individuos, Salta: 6 individuos y Tucumán: 12 individuos).

El procedimiento se basa en un análisis de varianza clásico que utiliza distancia entre haplotipos. En esta tesis el término haplotipo se utiliza para designar los patrones multilocus o perfiles de bandas obtenidos mediante la amplificación por PCR como lo utilizan Cattan-Toupance *et al*. (1998) y Papa y Gepts (2003). La matriz de distancia se construyó empleando el coeficiente de distancia Euclideano equivalente al número de diferencias entre los patrones de amplificación de dos individuos. Para establecer el nivel de significancia de los componentes de la varianza se obtuvo el estadístico ϕ (similar al estadístico F) mediante permutaciones al azar. La probabilidad de obtener por azar un estadístico mayor que el observado se toma como el nivel de significancia estadística. Para el análisis de varianza molecular se utilizó el software Arlequín versión 2.0 (Schneider *et al.*, 2000).

Marcador bioquímico. Faseolinas

Se analizaron cinco individuos por muestra poblacional y se observaron patrones de bandas entre los 43 y los 59 kD (KiloDaltons) que son característicos del centro de diversificación Andino. En la Figura 2.6 se presentan los patrones de faseolinas obtenidos para las nueve muestras de porotos silvestres estudiadas. La variabilidad observada entre y dentro de las muestras analizadas fue muy baja. El tipo de faseolina mas frecuente fue el "T" (Tendergreen), observándose el tipo "J" (Jujuy) con menor frecuencia (84% y 15%, respectivamente). En la Tabla 2.G se muestran los patrones observados en los 5 individuos de cada muestra. Estos resultados fueron realizados por duplicado para cada uno de los individuos para corroborar los patrones de faseolinas observados y analizados con los programas Gene Snap 6.05 y Gene Tools 3.06 de Syngene (Synoptics Ltd.).

Tabla 2.G. Tipos de faseolina observados en las muestras de porotos silvestres estudiadas

Provincia	Muestra	Faseolinas (en 5 individuos)
Salta	S1	T, T, T, T, T
	S2	T, T, T, T, T
Jujuy	J1	J, T, J, J, T
	J2	T, T, T, J, T
	J3	T, T, T, T, T
Tucumán	T1	T, J, T, T, T
	T2	T, T, T, T, T
	T3	T, T, T, J, T
	T4	T, T, T, J, T
	TOTAL	2 patrones diferentes

Figura 2.6. Patrones de faseolina de las muestras de porotos silvestres estudiadas. C, J, T y H: patrones control; J1-J3 y S1-S2: muestras poblacionales; a-e: individuos.

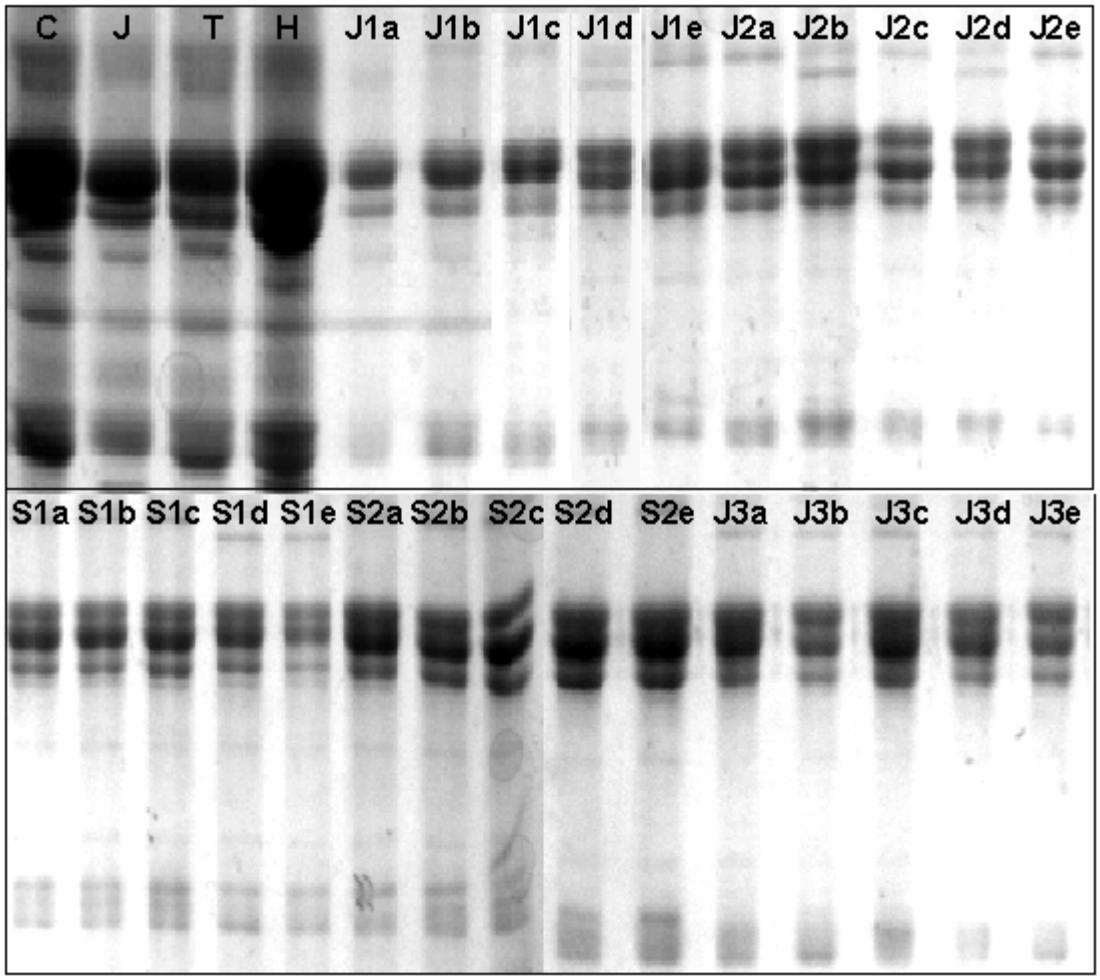
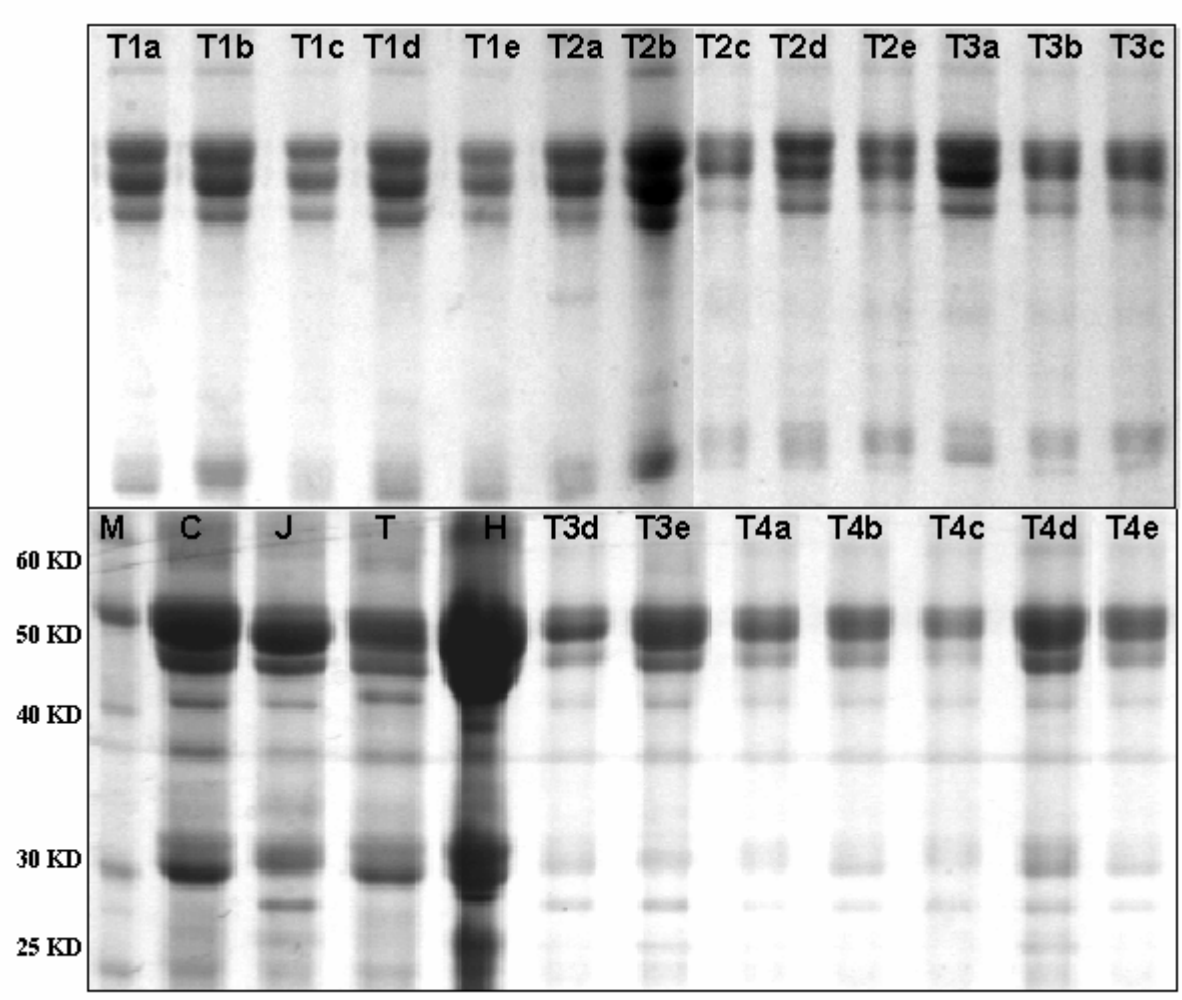


Figura 2.6. ***(Continuación)*** Patrones de faseolina de las muestras de porotos silvestres estudiadas. M: Marcador de peso molecular; C, J, T y H: patrones control; T1-T4: muestras poblacionales; a-e: individuos.



Marcadores moleculares

Marcadores RAPDS

Bandas polimórficas

De los 34 “primers” utilizados 26 generaron un patrón de amplificación claro para todos los genotipos. Solo seis “primers”: OPA02, OPA07, OPA09, OPA20, OPB10 y OPG03 (Figura 2.7), generaron bandas polimórficas y reproducibles. En la Tabla 2.H se resumen los resultados de las amplificaciones realizadas.

Tabla 2.H. Resultados de las reacciones de amplificación con “primers” RAPD a partir de ADN molde de las muestras de porotos silvestres estudiadas.

Número total de “primers”	26
Número de “primers” polimórficos	6
Total de bandas amplificadas por los “primers” polimórficos	46
Total de bandas polimórficas identificadas	7
Tamaño de las bandas amplificadas	390-2300 pb
Promedio de bandas amplificadas por “primer” polimórfico	7,7
Promedio de bandas polimórficas	1,2
Porcentaje de bandas polimórficas	15%
Porcentaje de “primers” polimórficos	23%

Los “primers” OPA02, OPA09 y OPG03 amplificaron fragmentos de ADN en todas las muestras analizadas, encontrándose en los patrones de amplificación polimorfismos entre y dentro de las muestras (Figuras 2.8 a 2.10). El “primer” OPA02 generó un total de 8 bandas (Figura 2.8). Una banda de 1470 pb (pares de bases) amplificada empleando este “primer“ se encuentra ausente en la muestra J1, en dos individuos de la muestra T3 y en uno de los individuos evaluados de las muestras J2 y S1.

Figura 2.7. Amplificación de ADN genómico de *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* utilizando 12 "primers" RAPD (Tabla 2.E pág 61). M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder.1: individuo J2b, 2: individuo S1b y N: control negativo sin ADN.

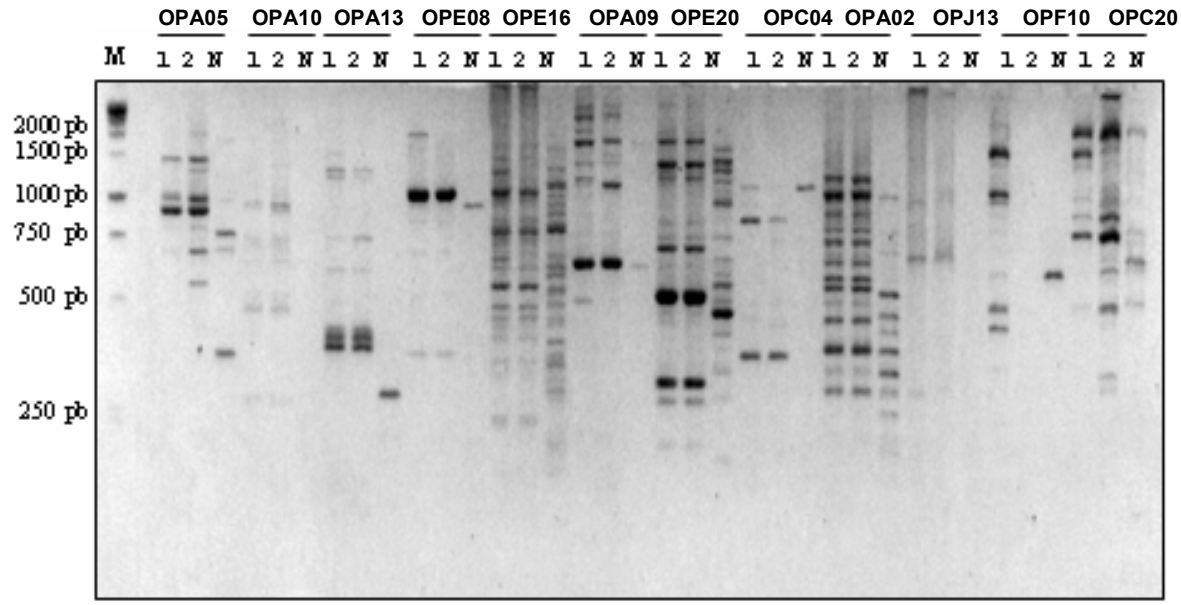


Figura 2.8. Amplificación de ADN de porotos silvestres utilizando el "primer" OPA02. M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder. S, J y T: muestras; a, b y c: individuos.

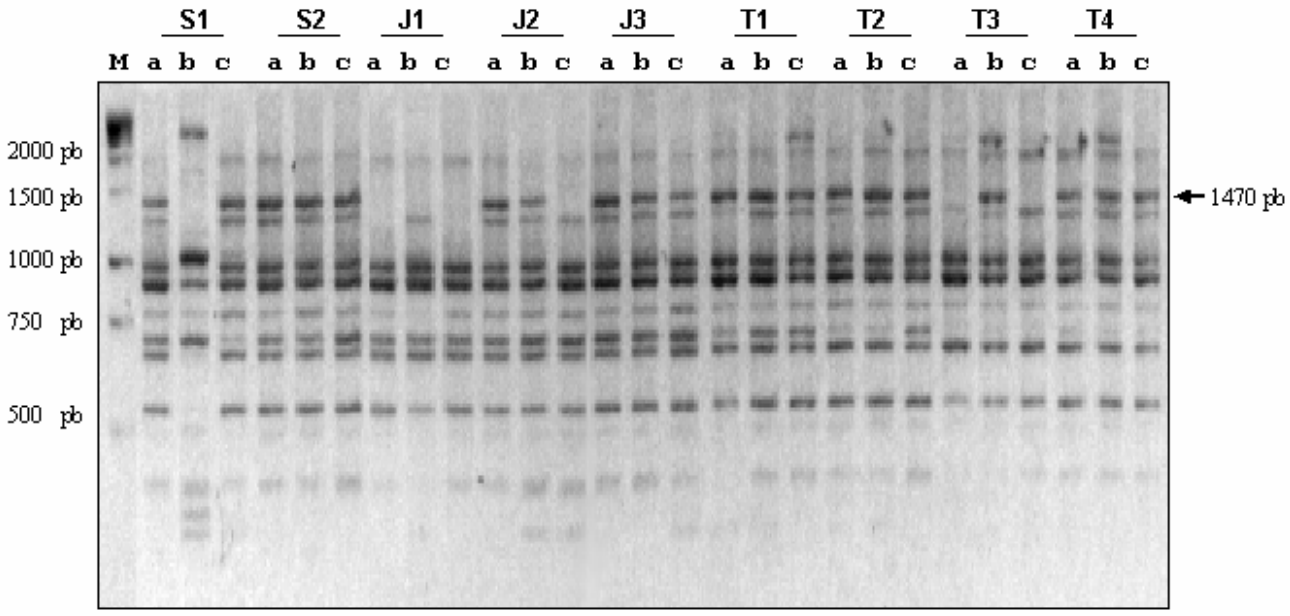


Figura 2.9. Amplificación de ADN de porotos silvestres utilizando el "primer" OPG03. M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder. S, J y T: muestras; a, b y c: individuos.

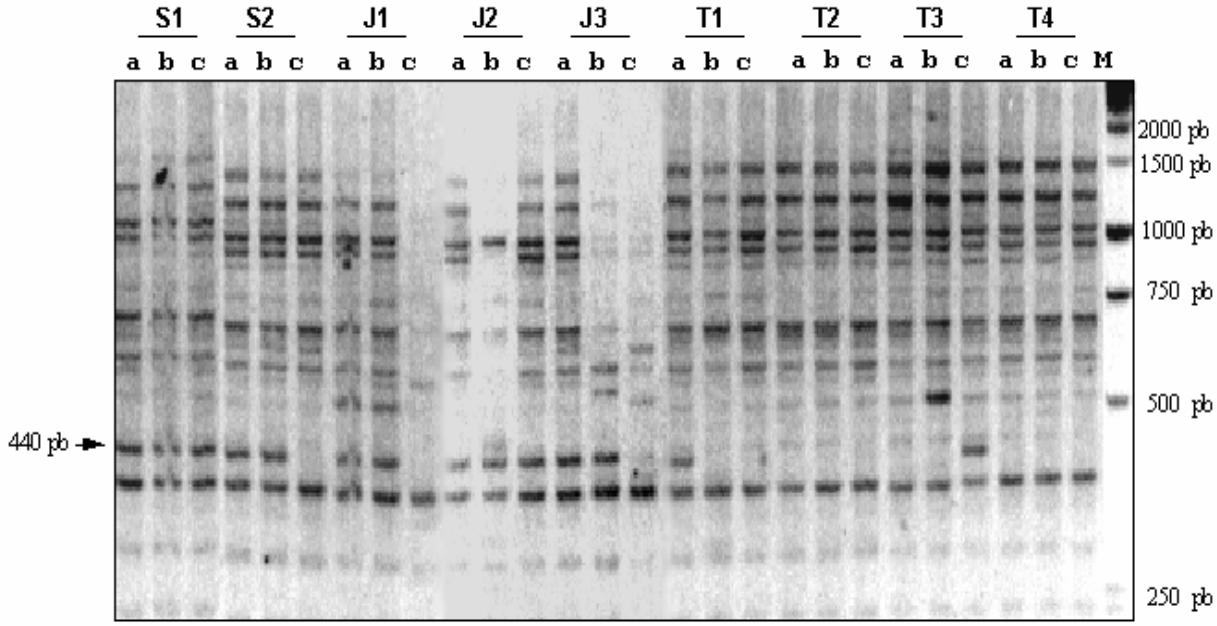
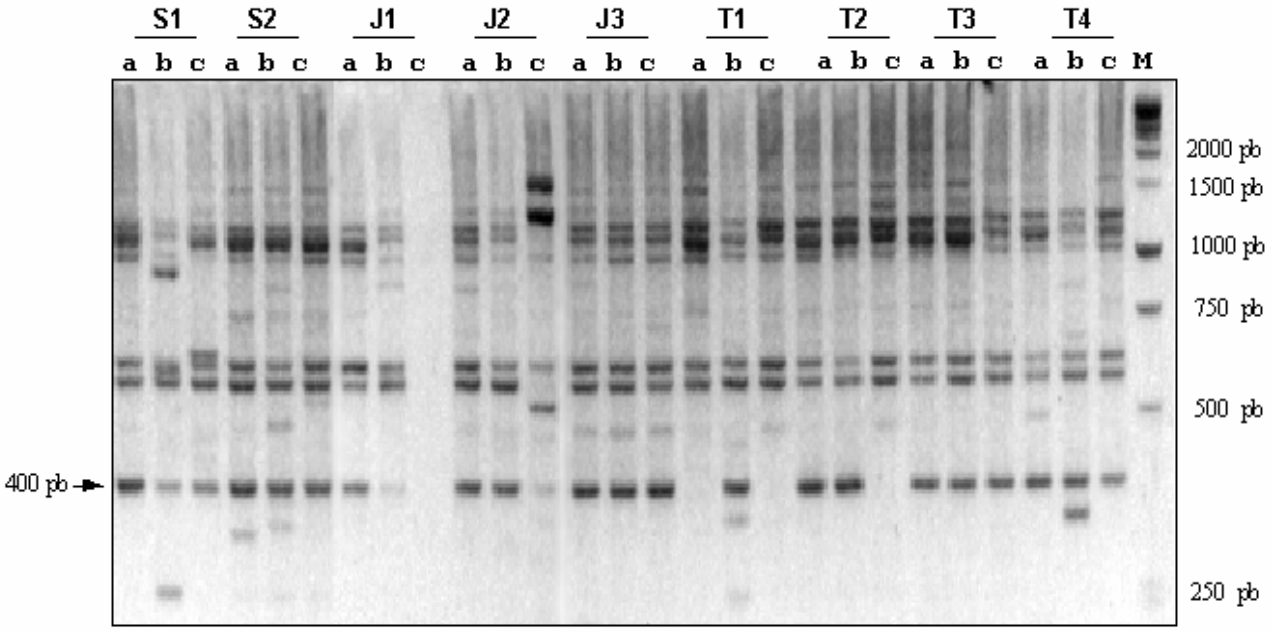
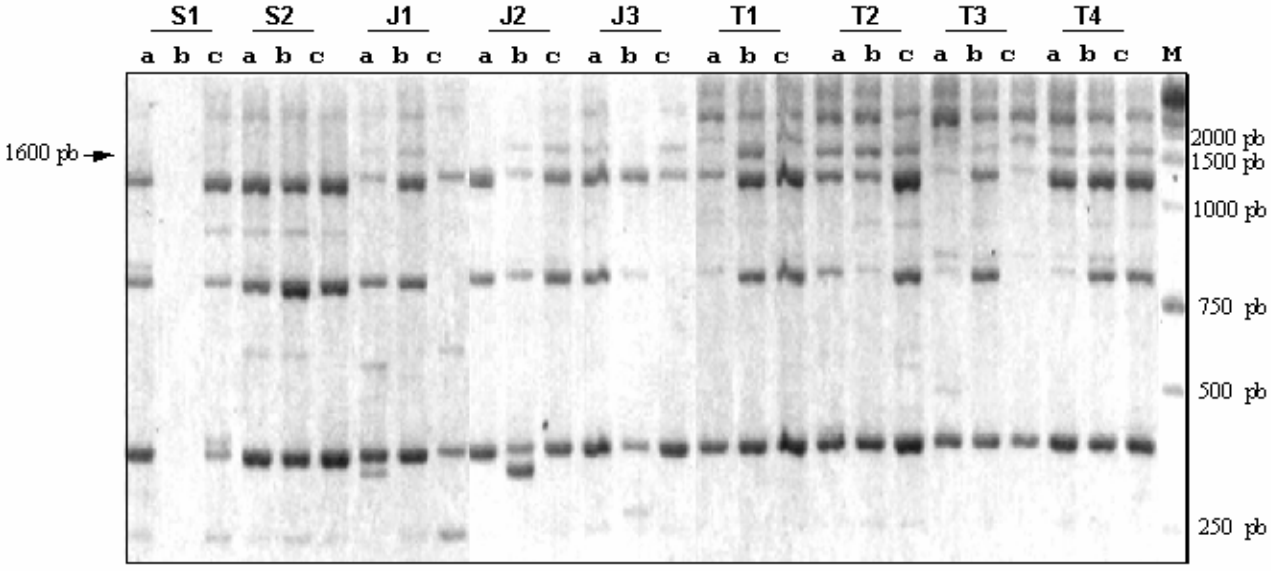


Figura 2.10. Amplificación de ADN de porotos silvestres utilizando el "primer" OPA09. M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder. S, J y T: muestras; a, b y c: individuos.



El “primer” OPG03 mostró diferencias entre las muestras al generar patrones distintos debido a la ausencia de una banda de 440 pb en los patrones de amplificación correspondientes a las muestras S2, J1, J3, T1, T2, T3 y T4 (Figura 2.9). Por otro lado, el “primer“ OPA09 amplificó 9 bandas en total con un fragmento de 400 pb que no se observó en los fingerprints de uno de los individuos de las muestras T1 y T2 (Figura 2.10). En la Figura 2.11 se muestran los patrones de amplificación obtenidos con el “primer“ OPA20. Se observó un total de 4 bandas, con una banda de 1600 pb que mostró polimorfismo. Puesto que la repetición de las amplificaciones generó patrones similares se descartó que los mismos se deban a otros factores que no sean diferencias a nivel de secuencias del ADN.

Figura 2.11. Amplificación de ADN de porotos silvestres utilizando el “primer” OPA20. M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder. S, J y T: muestras; a, b y c: individuos.



Análisis de agrupamientos y de coordenadas principales.

En la Tabla 2.I se presenta la matriz básica de datos obtenida a partir de los resultados de la amplificación realizada utilizando los seis “primers” RAPD que permiten detectar polimorfismos.

Tabla 2.I. Matriz Básica de Datos obtenida a partir de las amplificaciones de ADN de porotos silvestres aplicando la técnica de RAPD. TB: Total de Bandas amplificadas, BP: Bandas polimórficas, PM: Peso molecular en pares de bases. S, T, J: Muestras, a-c: individuos. Presencia de banda (1), ausencia de banda (0), (-) dato faltante.

				S1			S2			J1			J2			J3			T1			T2		
PRIMER	TB	BP	PM	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
OPA02	8	1	1470	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA07	5	2	390	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
			835	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
OPA20	4	1	1600	0	-	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1
OPA09	9	2	400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0
OPB10	4	1	1800	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
OPG03	10	1	440	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0

				T3			T4		
PRIMER	TB	BP	PM	a	b	c	a	b	c
OPA02	8	1	1470	0	1	0	1	1	1
OPA07	5	2	390	1	1	1	1	1	1
			835	0	1	-	1	1	1
OPA09	9	2	400	1	1	1	1	1	1
OPA20	4	1	1600	0	1	0	1	1	1
OPB10	4	1	1800	1	1	1	1	1	1
OPG03	10	1	440	0	0	1	0	0	0

El coeficiente de Jaccard mostró un rango entre 0,20 y 1 con una media de 0,62, mientras que el coeficiente de Simple Matching varió entre 0,25 y 1 con una media de 0,64. Los valores de similitud observados fueron mayores al usar el coeficiente de Simple Matching, lo que es esperable ya que se trata de un coeficiente simétrico que considera las dobles ausencias de banda en el cálculo de similitud.

En base a las matrices de similitud generadas con cada coeficiente de asociación se obtuvieron dos fenogramas empleando la técnica de UPGMA (Figuras 2.12 y 2.13). Los coeficientes de correlación cofenética (CCC) difirieron, siendo para Simple Matching 0,75 y para Jaccard 0,83, lo cual indica que el fenograma generado

empleando el coeficiente de Jaccard (J) es una mejor representación de la matriz de similitud que el fenograma resultante del análisis con el coeficiente de Simple Matching (SM). Esto coincide con lo sugerido por Grattapaglia y Ferreira (1996) sobre el uso de coeficientes de similitud asimétricos para el análisis de datos generados por marcadores moleculares dominantes como los RAPDs.

En ambos fenogramas la mayor parte de los individuos se agruparon según la provincia de origen, pero no por muestras poblacionales (Figuras 2.12 y 2.13). La mayoría de los porotos silvestres provenientes de las provincias de Jujuy y Tucumán formaron un solo grupo, asociándose a una similitud de 0,57 (SM) y 0,59 (J) a otro grupo que incluye la mayoría de las muestras de la provincia de Salta. En ambos fenogramas los individuos T1a y T1c de Tucumán se agruparon con la mayoría de los individuos de Salta. Los individuos S1b y S1c de Salta se hallan muy separados de los restantes de la misma provincia y forman parte de un grupo relacionado a muy bajos valores de similitud con el resto de los individuos estudiados. En el fenograma de Simple Matching, los individuos S1b y S1c se asocian con T3a de Tucumán (Trancas), mientras que en el fenograma de Jaccard se agrupan con J3c de Jujuy (S.S. de Jujuy).

La mayor parte de los individuos de Tucumán son indistinguibles entre sí, con valores de similitud de 1,00. Otros muestran relaciones de similitud diferentes en ambos fenogramas (por ejemplo T3a y T2c). Las relaciones de algunos individuos de Jujuy también son diferentes en ambos fenogramas (por ejemplo J1b y J3c).

Figura 2.12. Fenograma de 27 individuos pertenecientes a muestras de porotos silvestres procedentes de tres provincias del NOA, analizados mediante marcadores RAPD (Coeficiente de similitud de Simple Matching, CCC: 0,75)

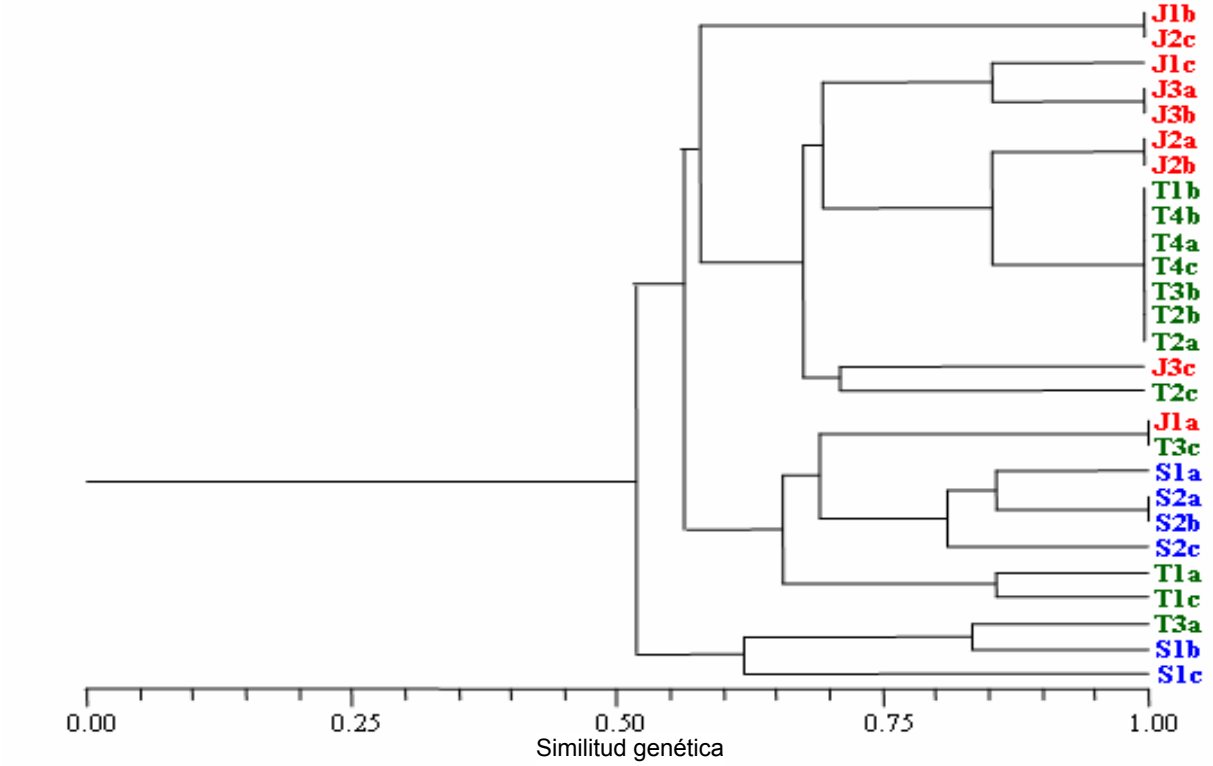
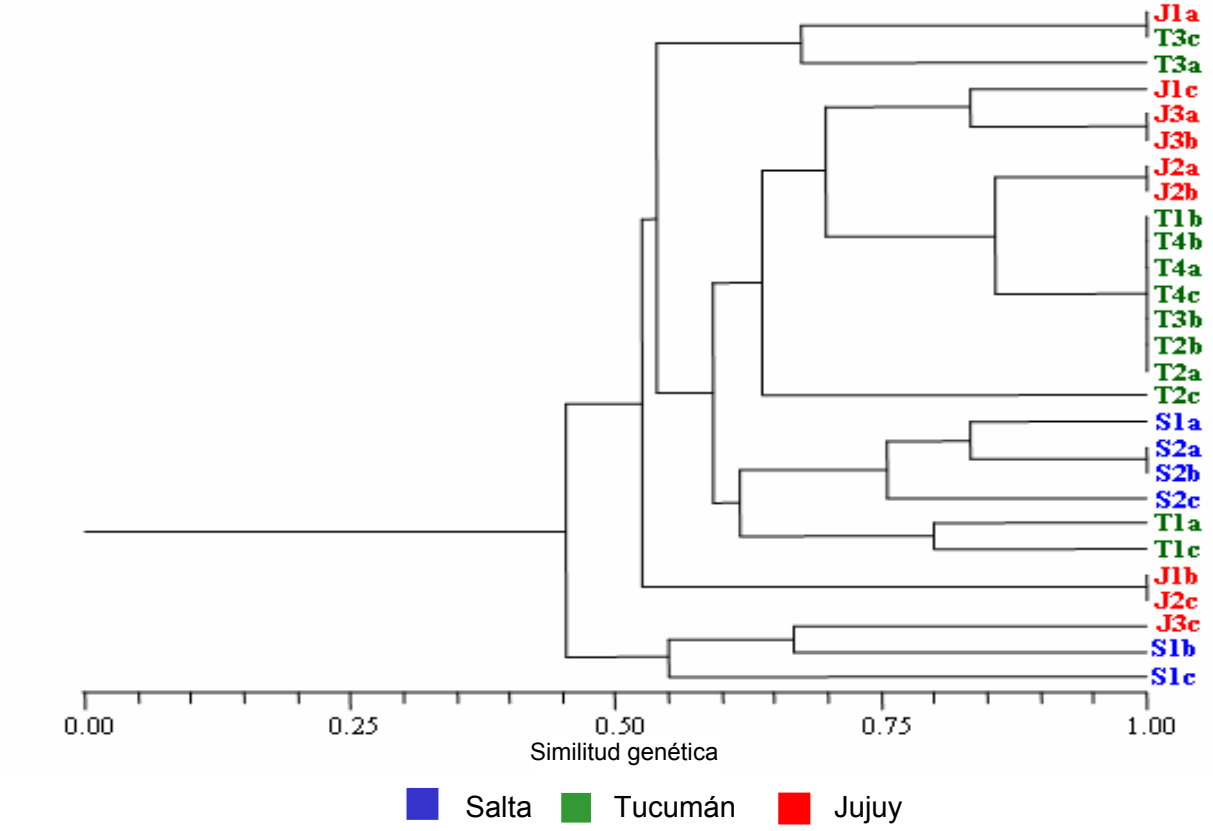


Figura 2.13. Fenograma de 27 individuos pertenecientes a muestras de porotos silvestres, procedentes de tres provincias del NOA analizados mediante marcadores RAPD (Coeficiente de similitud de Jaccard, CCC: 0,83)



Los resultados obtenidos mediante el Análisis de Coordenadas Principales se muestran en las Figuras 2.14 y 2.15. Al aplicar el método de ordenación a partir de la matriz de similitud se extrajeron las coordenadas principales y los valores propios (eigen valores). En la Tabla 2.J se muestran los eigenvalores que representan los porcentajes de la variabilidad explicados por cada coordenada principal utilizando los coeficientes de Simple Matching y Jaccard. Las cuatro primeras coordenadas calculadas acumularon más del 70% de la variación de los genotipos.

Tabla 2.J. Eigenvalores de las primeras cuatro coordenadas principales aplicando los coeficientes de asociación de Simple Matching y Jaccard (CP: Coordenada Principal).

CP	Simple Matching			Jaccard		
	Eigenvalor	Porcentaje	Acumulado	Eigenvalor	Porcentaje	Acumulado
1	2.72142711	27.5944	27.5944	2.51049226	23.3475	23.3475
2	2.54842101	25.8401	53.4345	2.31143305	21.4962	44.8437
3	1.64021031	16.6312	70.0657	1.50986784	14.0417	58.8854
4	1.43409886	14.5413	84.6070	1.30663983	12.1517	71.0371

En las Figuras 2.14 y 2.15 se muestran los gráficos de las tres primeras coordenadas principales. Empleando el coeficiente de Simple Matching se observa una menor dispersión de los individuos en comparación con el índice de Jaccard. En ambos gráficos la primera coordenada principal ordena a las muestras de Tucumán hacia la izquierda del gráfico, siendo los individuos de las muestras T1 y T3 los que muestran menor similitud. Las muestras de la provincia de Jujuy se ordenan en el centro del gráfico, presentando mayor similitud entre individuos con el coeficiente de Simple Matching. El individuo J3c se ordenó hacia la izquierda mostrando menor similitud con el resto de los individuos de Jujuy, como se observa también en los fenogramas.

Figura 2.14. Análisis de Coordenadas Principales de 27 individuos pertenecientes a muestras de porotos silvestres procedentes de tres provincias del NOA, analizados mediante marcadores RAPD (Coeficiente de similitud de Simple Matching, % de la variabilidad total: 70%, COORP: Coordenada Principal)

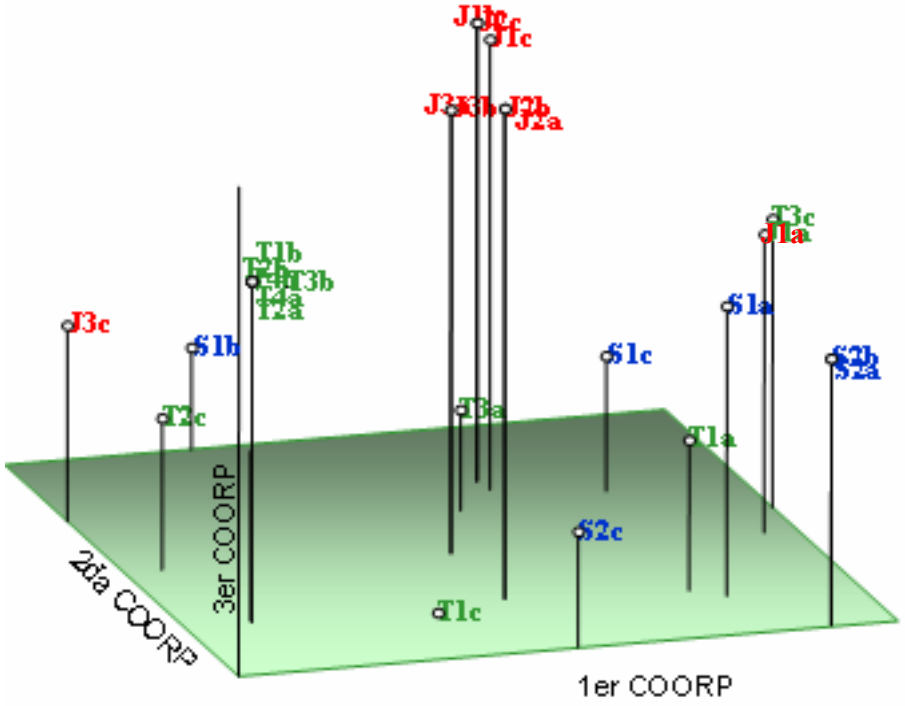
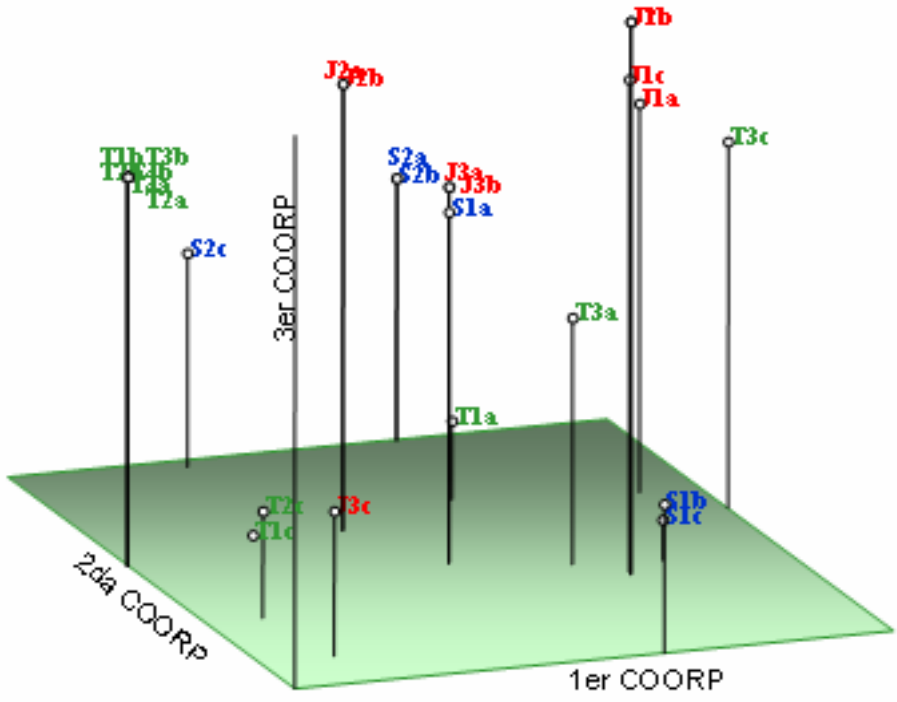


Figura 2.15. Análisis de Coordenadas Principales de 27 individuos pertenecientes a muestras de porotos silvestres procedentes de tres provincias del NOA, analizados mediante marcadores RAPD (Coeficiente de similitud de Jaccard, % de la variabilidad total: 59%, COORP: Coordenada Principal)



En la Figura 2.14 la primera coordenada principal ordena a las muestras de Salta en el extremo inferior derecho del gráfico, a excepción del individuo S1b que se ubicó hacia la izquierda y hacia atrás. En el gráfico obtenido empleando el coeficiente de Jaccard (Figura 2.15) la segunda coordenada principal ordena a la mayoría de las muestras de Salta desde el centro hacia atrás del gráfico, con excepción de los individuos S1b y S1c que se ubican hacia la izquierda y adelante.

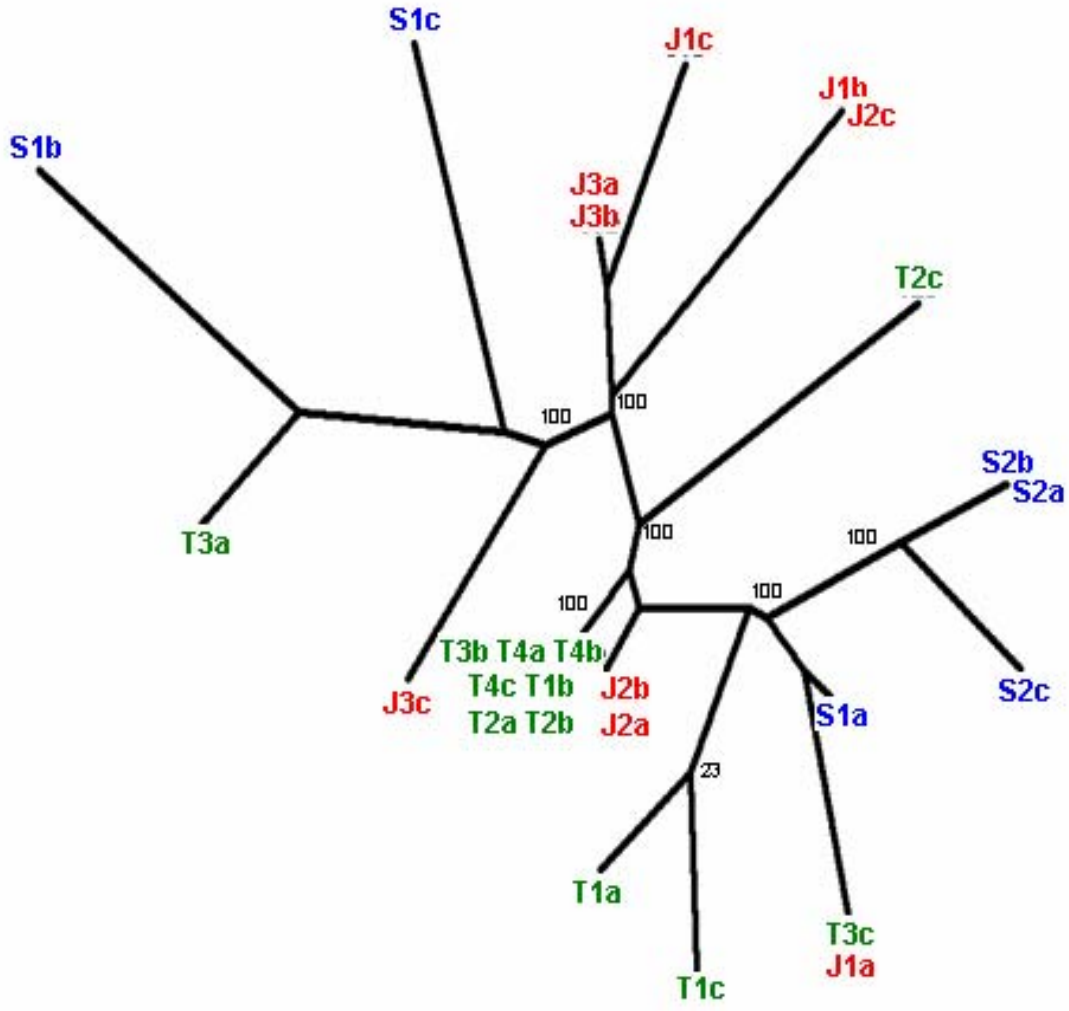
La variación total expresada en los gráficos es de 70% para el coeficiente de Simple Matching y de 59% para el de Jaccard.

Empleando la técnica de Neighbor Joining a partir de la matriz de similitud de Jaccard se generó el "network" que se muestra en la Figura 2.16. Se observó gran uniformidad en la mayoría de los individuos de Tucumán que formaron un grupo con elevada similitud, al igual que en los fenogramas. La muestra S2 de Salta forma un grupo bien sustentado por valores de bootstrap, y forma un cluster con los individuos S1a, T3c y J1a. Aquellos individuos de Salta que en el fenograma UPGMA se agruparon mostrando una menor similitud (S1b y S1c), en este análisis se asociaron con los individuos T3a y J3c, aunque se hallan separados por una gran distancia genética, expresada por la mayor longitud de las ramas del árbol. Se podría destacar que no hay agrupamientos por muestras, excepto S2.

Aplicando el test estadístico de Mantel (1967) se observó una correlación significativa entre las distancias geográficas existentes entre los sitios de recolección de las muestras poblacionales y las matrices de similitud de Simple Matching (r =0,221, p< 0,05) y Jaccard (r = 0,235; p< 0,05) obtenidas a partir de los marcadores RAPD. Por otro lado, la correlación entre las diferencias de altura entre

los sitios y las matrices de similitud fue altamente significativa (SM: r =0,320; p< 0,01 y J: r =0,333; p< 0,01).

Figura 2.16. Árbol de Neighbor Joining de porotos silvestres usando marcadores RAPD. T, J y S: muestras; a-c: individuos.



Marcadores ISSR

Bandas polimórficas

Se trabajó con un total de 10 "primers" que generaron patrones de amplificación para todos los genotipos (Figura 2.17), sin embargo, sólo 4 "primers", A, C, D y G, generaron bandas polimórficas (Tabla 2.K). En la Tabla 2.L se muestra un resumen de los productos amplificados.

Figura 2.17. Amplificación de ADN de porotos silvestres utilizando ocho "primers" ISSR (Tabla 2.F pág. 62). A-F: "primers", 1: individuo J1a, 2: individuo S2b.

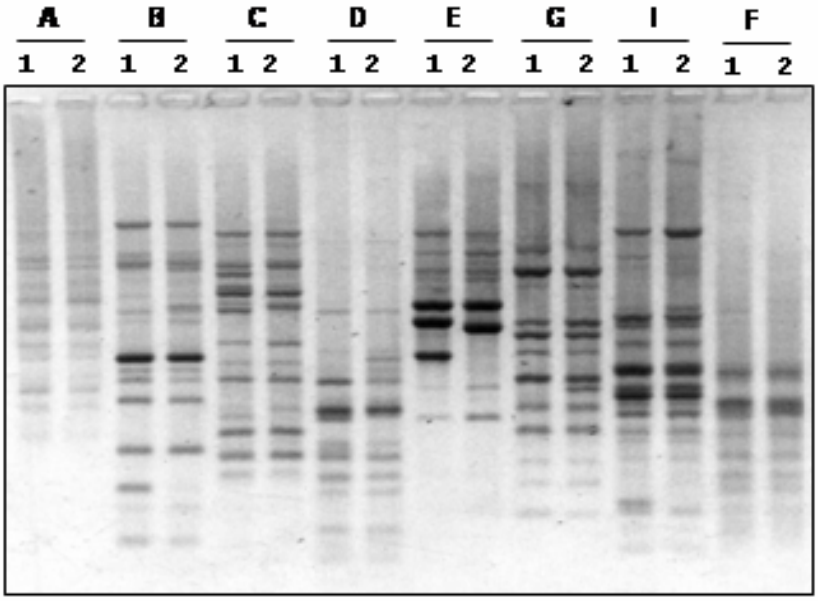


Tabla 2.K. Productos de amplificación generados con cada "primer" ISSR polimórfico.

Primer	Secuencia (5'-3')	Temperatura de hibridación (ºC)	Total de bandas amplificadas	Total de bandas polimórficas
A	$(AC)_8$	55	9	2
C	$(AG)_8CG$	48	12	7
D	$(AG)_8$	48	12	2
G	$GAG(CAA)_5$	48	9	4

Tabla 2.L. Síntesis de las reacciones de amplificación obtenidas de porotos silvestres (*Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus*) mediante marcadores ISSR.

Número total de "primers"	10
Número de "primers" polimórficos	4
Total de bandas amplificadas por los "primers" polimórficos	42
Total de bandas polimorficas identificadas	15
Tamaño de las bandas amplificadas	260-1800 pb
Promedio de bandas amplificadas por "primer" polimórfico	10,5
Promedio de bandas polimórficas	4
Porcentaje de bandas polimórficas	36%
Porcentaje de "primers" polimórficos	40%

El número total de bandas amplificadas fue de 42, de las cuales sólo 15 fueron polimórficas. El promedio de bandas generadas por "primer" polimórfico fue de 10,5 con un máximo de 12 para los "primers" C y D, y con un promedio de 4 bandas polimórficas por "primer" (Tabla 2.K). El 60% de los "primers" que generaron polimorfismo tienen secuencias de dinucleótidos repetidas en tandem, uno con anclaje 3' y dos sin anclaje. El "primer" de trinucleótidos que fue polimórfico posee anclaje 5'.

En las Figuras 2.18 a 2.21 se muestran las amplificaciones obtenidas empleando los "primers" A, C, D y G. Del total de bandas obtenidas con el "primer" A (9 bandas) sólo dos generaron polimorfismo (Figura 2.18). Las amplificaciones de ADN con el "primer" C (Figura 2.19) presentaron un mayor número de bandas polimórficas (7 bandas). Una banda de aproximadamente 1000 pb sólo se observó a partir del ADN de los individuos de la muestra S2 y dos individuos de la muestra S1. Con el "primer" D se amplificó un total de 12 bandas y una banda de 540 pb mostró polimorfismo entre y dentro de las muestras ya que solo se observó en los patrones obtenidos a partir del ADN de individuos de las muestras J1, J2, S1, S2, J3 y T2 (Figura 2.20). La mayoría de las bandas amplificadas con el "primer" G (Figura 2.21) son monomórficas. Las bandas polimórficas generadas mostraron variabilidad entre

y dentro de las muestras. Una banda de aproximadamente 600 pb se amplificó a partir del ADN de todos los individuos con excepción de aquéllos de las muestras S1 y S2.

Figura 2.18. Amplificación de ADN de porotos silvestres utilizando el "primer" A. M: Marcador de Peso molecular. **J**, **S** y **T**: Muestras poblacionales, **a**-**c**: individuos.

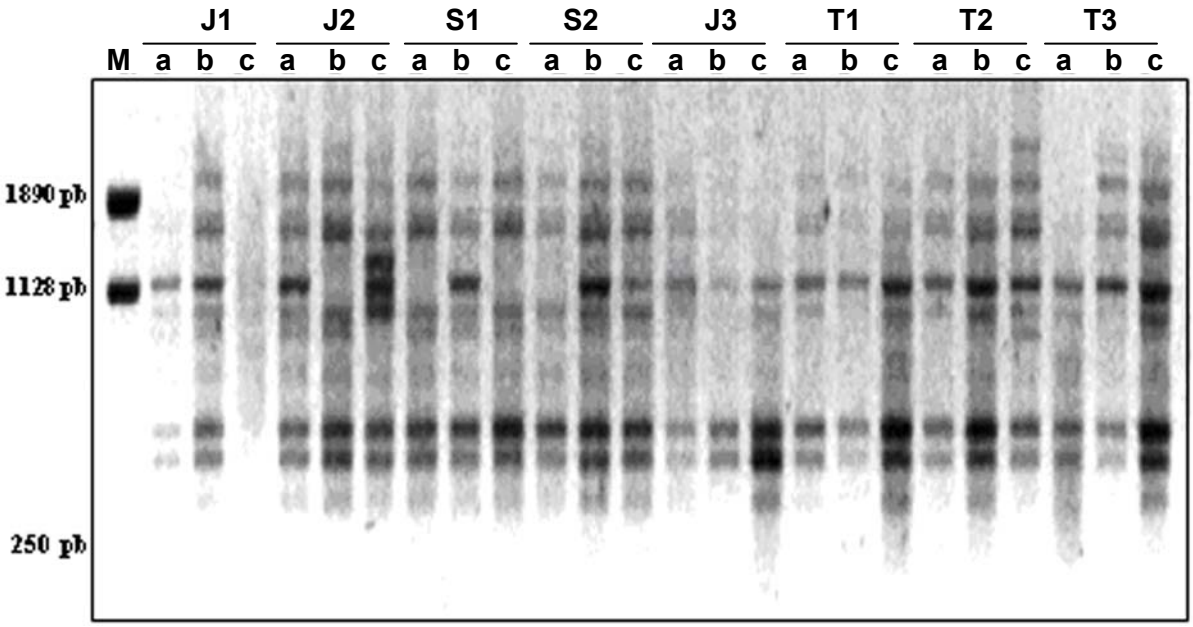


Figura 2.19. Amplificación de ADN de porotos silvestres utilizando el "primer" C. **J**, **S** y **T**: Muestras poblacionales, **a**-**c**: individuos.

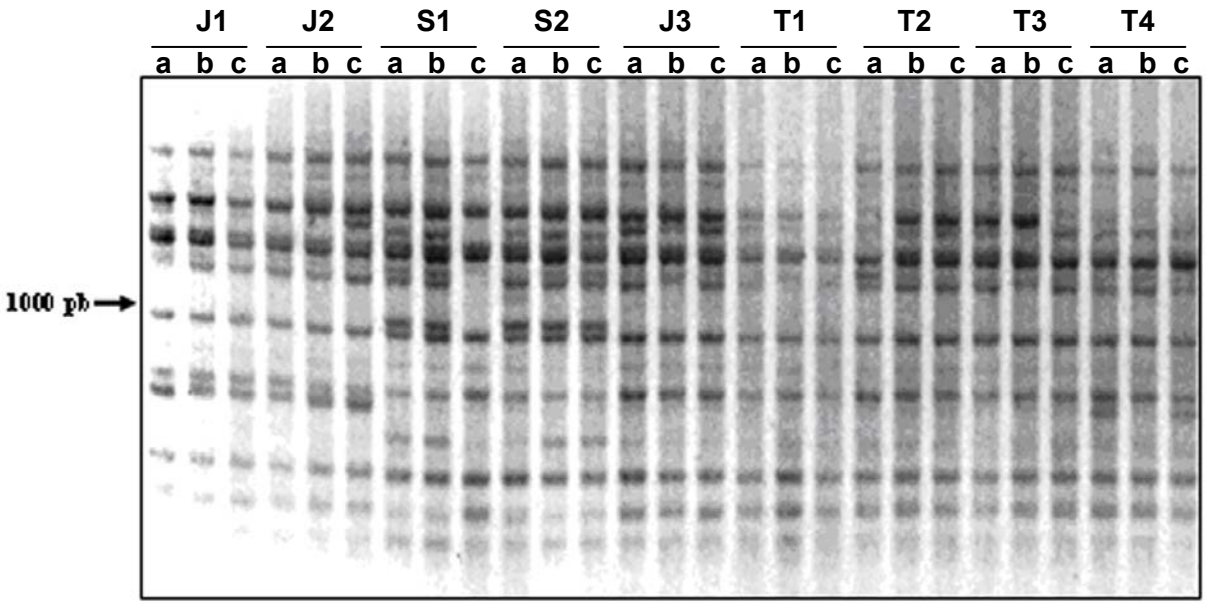


Figura 2.20. Amplificación de ADN de porotos silvestres utilizando el "primer" D. **J**, **S** y **T**: Muestras poblacionales; **a-c**: individuos.

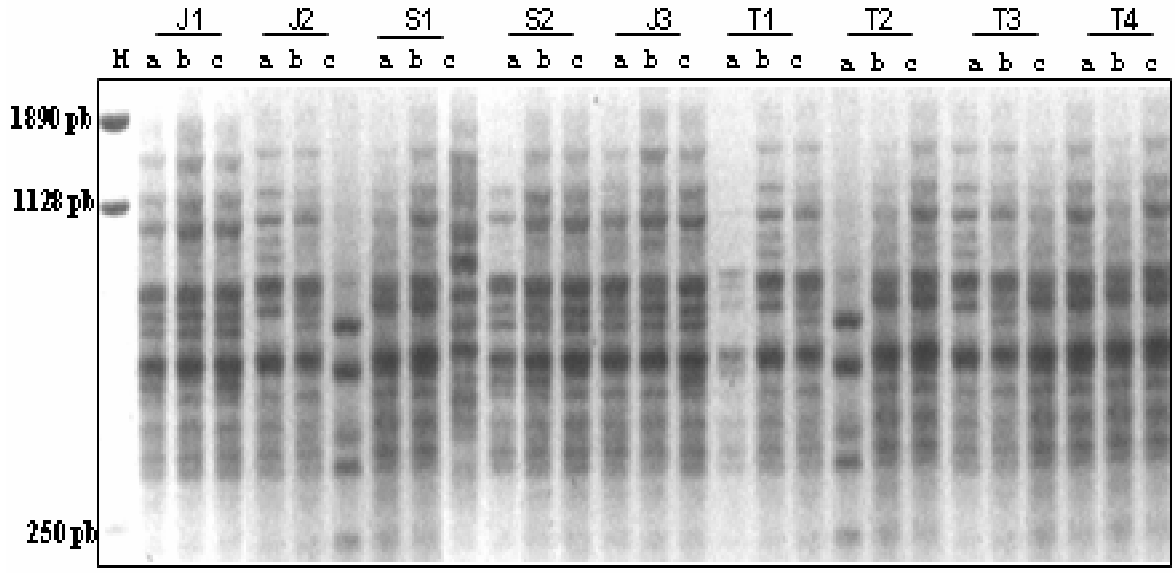
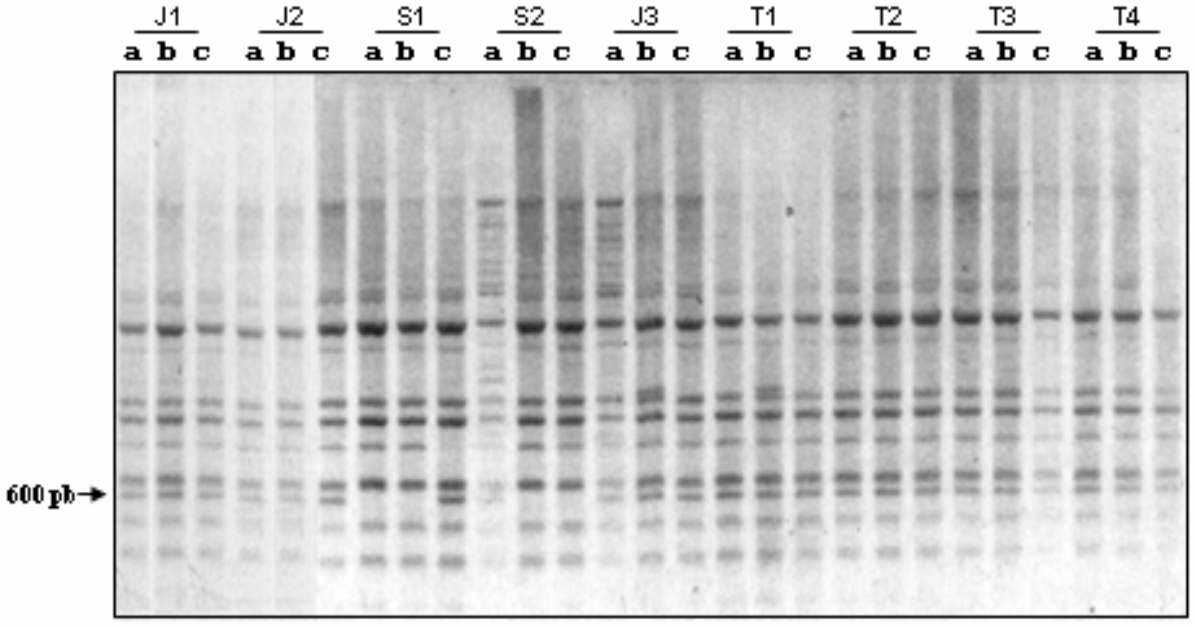


Figura 2.21. Amplificación de ADN de porotos silvestres utilizando el "primer" G. **J**, **S** y **T**: Muestras poblacionales, **a**-**c**: individuos.



Análisis de agrupamientos y de coordenadas principales.

La matriz básica de datos obtenida a partir de los fragmentos amplificados mediante ISSR-PCR se muestra en la Tabla 2.M.

El coeficiente de Simple Matching varió entre 0,36 y 1 con una media de 0,71, y el coeficiente de Jaccard mostró un rango entre 0,17 y 1,00 con una media de 0,50.

Los fenogramas obtenidos empleando los dos coeficientes de asociación agruparon a los individuos principalmente según su provincia de origen (Figuras 2.22 y 2.23). Los individuos de Tucumán formaron un cluster con una similitud de 0,75 (SM) y 0,66 (J) y se asociaron al cluster de las muestras de Jujuy con una similitud de 0,74 (SM) y 0,50 (J). Las muestras de Salta presentaron menor similitud y se asociaron formando un grupo a una similitud de 0,68 (SM) y 0,52 (J), excepto el individuo S1c, que es el más distante dentro del cluster Jujuy-Tucumán.

Con el coeficiente de Simple Matching los individuos T1a y T3a de Tucumán mostraron mayor similitud con los individuos provenientes de Jujuy. Por otro lado el individuo J3b de Jujuy se agrupó en el mismo cluster que los individuos de Tucumán.

En el fenograma generado a partir del coeficiente de Jaccard todos los individuos de la muestra J3 de Jujuy se agruparon mostrando mayor similitud con individuos de la provincia de Tucumán que con el resto de las muestras de Jujuy.

La bondad de ajuste de ambos fenogramas fue altamente significativa (Coeficiente de Correlación Cofenética, CCC= 0.85).

Tabla 2.M. Matriz Básica de Datos obtenida a partir de las amplificaciones de ADN de porotos silvestres aplicando la técnica de ISSR. (PR: "primer"; TB: Total de bandas amplificadas; BP: Bandas polimórficas; S, J y T: Muestras; a-c: tres individuos; (-): dato faltante).

				J1			J2			J3			S1			S2			T1			T2			T3			T4		
PR	TB	BP	Bandas	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
A	9	2	1 (2300pb)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
			2 (930pb)	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	-	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
C	12	7	2 (2390 pb)	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
			3 (1835 pb)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			4 (1530 pb)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
			5 (1200 pb)	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
			7 (1000 pb)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			9 (835 pb)	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
			10 (600 pb)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	12	2	2 (540 pb)	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			3 (400 pb)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
G	9	4	2 (1200 pb)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			3 (440 pb)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			5 (800 pb)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
			6 (600 pb)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Figura 2.22. Fenograma de 27 individuos pertenecientes a muestras de porotos silvestres, procedentes de tres provincias del NOA analizados mediante marcadores ISSR (Coeficiente de similitud de Simple Matching, CCC: 0,85)

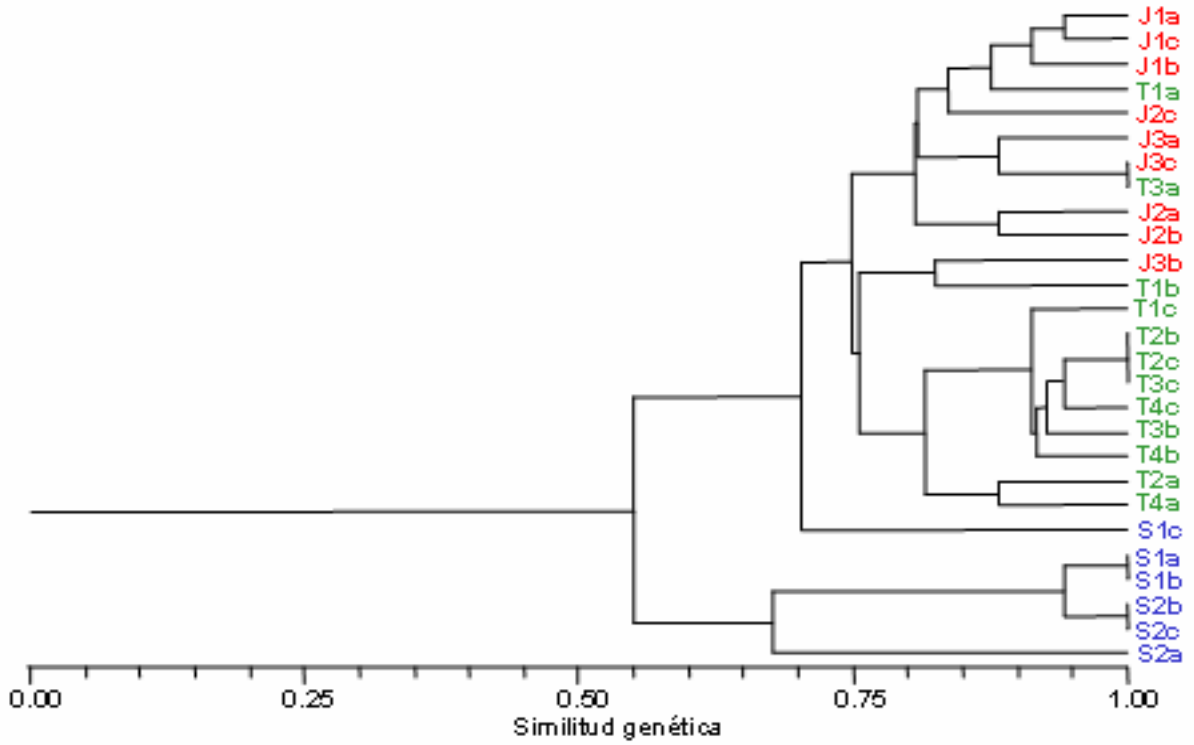
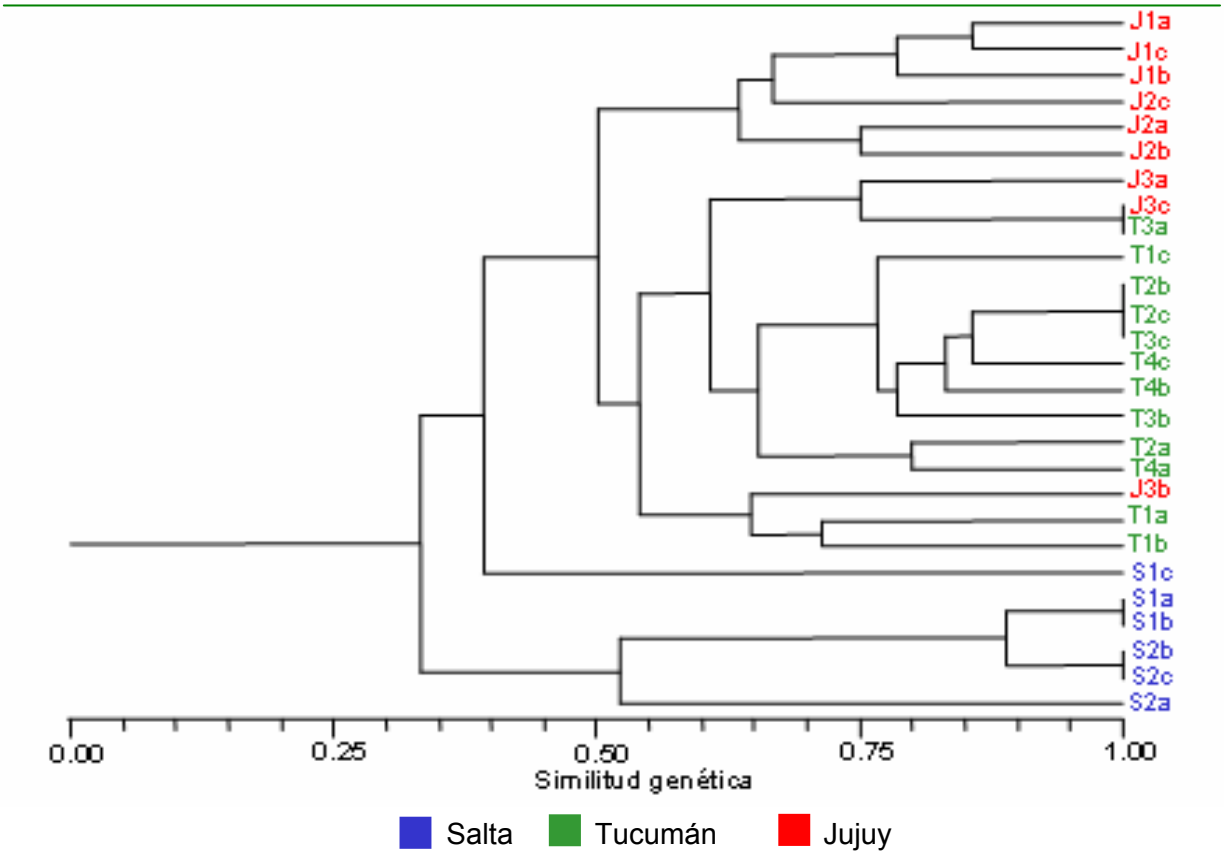


Figura 2.23. Fenograma de 27 individuos pertenecientes a muestras de porotos silvestres, procedentes de tres provincias del NOA analizados mediante marcadores ISSR (Coeficiente de similitud de Jaccard, CCC: 0,85)



Al aplicar el método de ordenación las cuatro primeras coordenadas calculadas acumularon más del 63% de la variación de los genotipos (Tabla 2.N).

En las Figuras 2.24 y 2.25 se observan los gráficos de las tres primeras coordenadas principales generadas empleando los coeficientes de Simple Matching y Jaccard, respectivamente. En ambos gráficos las coordenadas ordenan a los individuos en tres grupos que coinciden con sus provincias de origen. En el extremo izquierdo del gráfico se agrupan la mayoría de los individuos procedentes de la provincia de Salta y a la derecha los de las provincias de Tucumán y Jujuy. Ambos grupos se separan principalmente por la primera coordenada principal. La segunda coordenada principal agrupa en el extremo derecho del gráfico hacia atrás a los individuos de la provincia de Jujuy (que muestran gran dispersión) y hacia adelante a las muestras de Tucumán (con mayor similitud entre los individuos), aunque esta separación no está bien definida. Los individuos T1a, T1b y S1c se ordenaron mostrando gran similitud con los individuos de Jujuy. La variación total expresada en el gráfico es de 66,36% para el coeficiente de Simple Matching y de 55,69% para el coeficiente de Jaccard.

Tabla 2.N. Eigenvalores de las primeras cuatro coordenadas principales aplicando los coeficientes de asociación de Simple Matching y Jaccard (CP: Coordenada Principal).

CP	Simple Matching			Jaccard		
	Eigenvalor	Porcentaje	Acumulado	Eigenvalor	Porcentaje	Acumulado
1	2.71087895	36.1120	36.1120	3.58325060	27.5752	27.5752
2	1.44565917	19.2578	55.3698	2.25510671	17.3543	44.9295
3	0.82499635	10.9899	66.3597	1.39832734	10.7609	55.6905
4	0.59006873	7.8604	74.2201	1.04362540	8.0313	63.7218

Figura 2.24. Análisis de Coordenadas Principales de 27 individuos pertenecientes a muestras de porotos silvestres procedentes de tres provincias del NOA, analizados mediante marcadores ISSR. S, J y T: muestras; a-c: individuos (Coeficiente de similitud de Simple Matching, % de la variabilidad total: 66,36%)

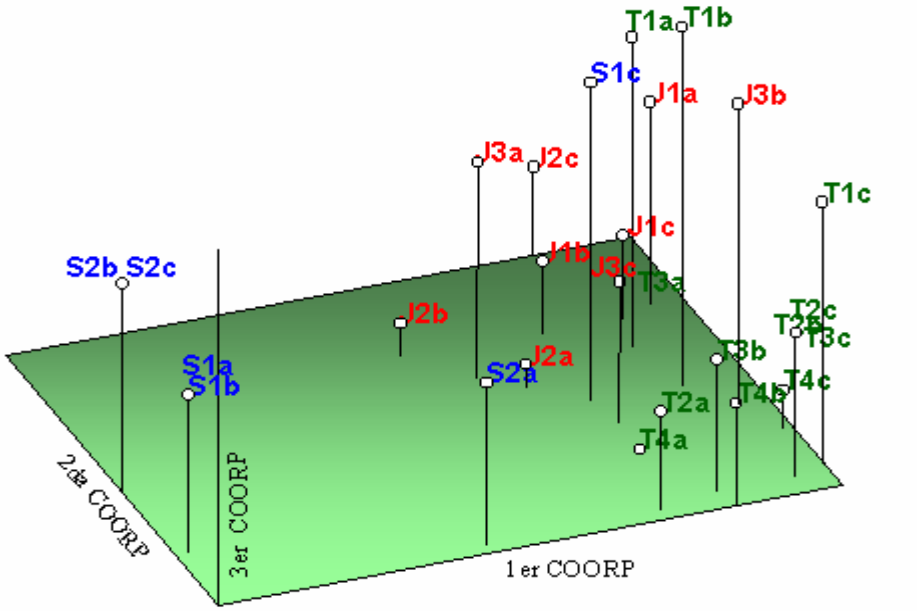
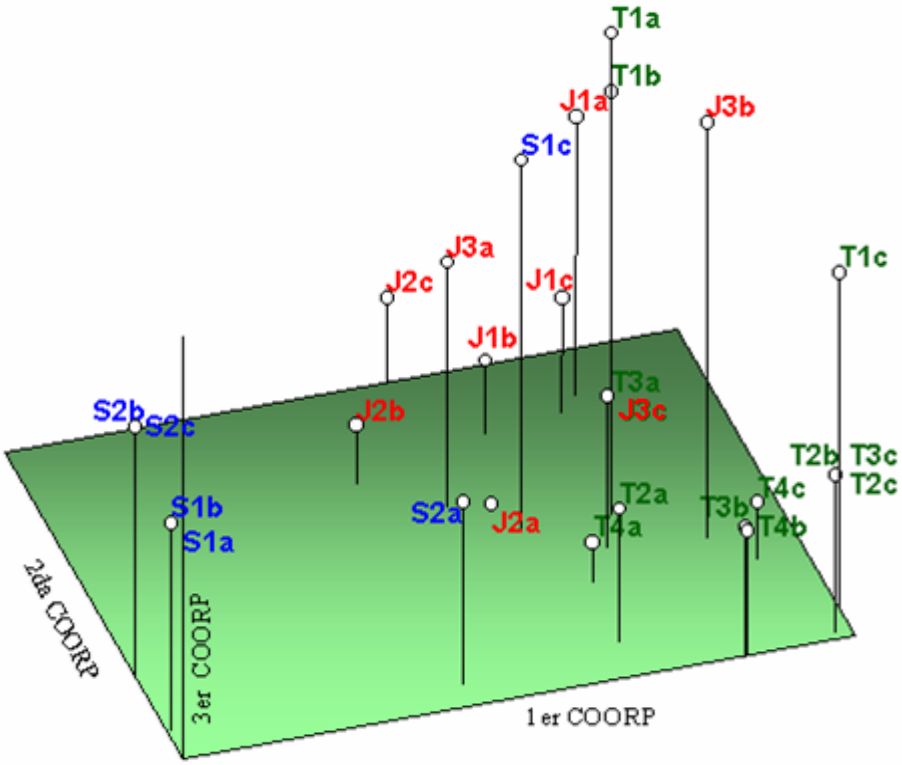
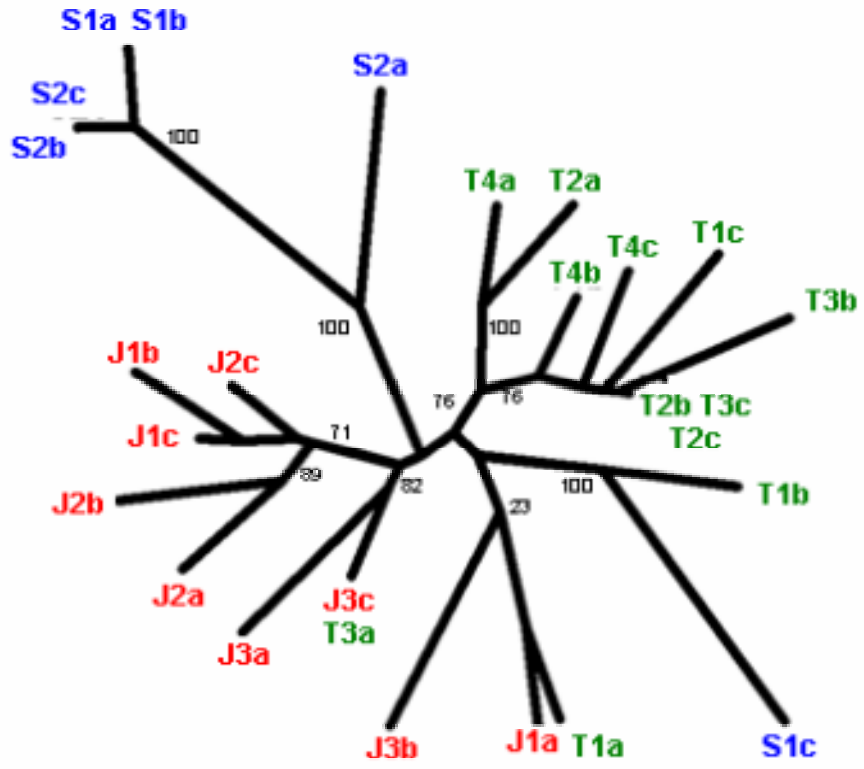


Figura 2.25. Análisis de Coordenadas Principales de 27 individuos pertenecientes a muestras de porotos silvestres procedentes de tres provincias del NOA, analizados mediante marcadores ISSR. S, J y T: muestras; a-c: individuos (Coeficiente de similitud de Jaccard, % de la variabilidad total: 55,69%)



Empleando la técnica de Neighbor Joining a partir de la matriz de similitud de Jaccard se generó el "network" que se muestra en la Figura 2.26. Se observa el agrupamiento de los individuos por provincia de origen. Las muestras de Santa Victoria (Salta) formaron un grupo separado de los restantes a una gran distancia. El individuo más diferenciado dentro de dicho grupo es S2a y el único que se ubicó fuera del mismo es S1c. Este último se agrupa con T1b de Tucumán, aunque a muy bajos niveles de similitud. Por otro parte, las muestras de Tucumán y Jujuy formaron dos clusters bien definidos y soportados por altos valores de bootstrap. El individuo T3a de Tucumán mostró gran similitud con la muestra J3 de Jujuy. El cluster formado por los individuos J3b, J1a y T1a tiene un bajo soporte de bootstrap.

Figura 2.26. Árbol de Neighbour Joining de porotos silvestres mediante marcadores ISSR. S, J y T: Muestras; a-c: individuos.



Se observó una correlación altamente significativa entre las distancias geográficas existentes entre los sitios de recolección de las muestras poblacionales y las matrices de similitud de Simple Matching (r =0,508, p< 0,001) y Jaccard (r = 0,496; p< 0,001) obtenidas a partir de los marcadores ISSR. Del mismo modo, la correlación entre las diferencias de altura entre los sitios y las matrices de similitud fue altamente significativa (SM: r =0,654; p< 0,001 y J: r =0,592; p< 0,001).

Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA).

El total de haplotipos (patrones de bandas) observados con los marcadores RAPD fue menor que con los ISSR (16 y 21 haplotipos respectivamente). En la Tabla 2.O se muestran los haplotipos obtenidos por muestra.

Tabla 2.O. Haplotipos obtenidos por muestra poblacional empleando los marcadores moleculares.

Provincia	Muestra	Haplotipos (RAPD)	Haplotipos (ISSR)
Jujuy	J1	1, 3, 10	1, 2, 3
(6 hapl. RAPD)	J2	5, 3	4, 5
(8 hapl. ISSR)	J3	4, 7	10, 11, 12
Salta	S1	14,15, 16	6, 7
(5 hapl. RAPD)			
(4 hapl. ISSR)	S2	8, 9	8, 9
Tucumán	T1	11, 6, 12	13, 14, 15
(6 hapl. RAPD)	T2	6, 13	16, 17
(10 hapl. ISSR)	T3	2, 6, 1	12, 18, 17
	T4	6	19, 20, 21
Total de haplotipos		16	21

El resultado del Análisis de la Varianza Molecular se muestra en la Tabla 2.P. El AMOVA mostró una subdivisión poblacional significativa a nivel de grupos de muestras (provincias) y gran polimorfismo dentro de cada provincia (86,71% de la variación total para RAPD y 58,54% para ISSR).

Tabla 2.P. Análisis de la varianza molecular existente en las muestras de porotos silvestres (*Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus*).

	RAPD			ISSR		
Fuente de variación	% de la varianza total	P	Estadístico ϕ	% de la varianza total	P	Estadístico ϕ
Entre provincias	13,29 %	<0,001	ϕ_{st} =0,1329	41,46%	<0,001	ϕ_{st} =0,4146
Dentro de provincias	86,71%			58,54%		

DISCUSIÓN

Análisis de diversidad genética.

El nivel de polimorfismo detectado en las muestras de porotos silvestres en base al análisis de las proteínas de reserva fue bajo. Sólo se identificaron dos patrones diferentes de faseolinas (T y J) los cuales son característicos del acervo génico Andino (Gepts, 1988). La faseolina T se observó con alta frecuencia (84%) y en todas las muestras, y la faseolina J sólo se observó con una frecuencia de un 15% y en individuos de las muestras J1, J2, T1, T3 y T4. El bajo nivel de polimorfismo encontrado con los patrones de faseolinas de los porotos silvestres coincide con el bajo nivel de polimorfismo observado entre 21 muestras silvestres del NOA, con un 76% de faseolina T y un 24% de faseolina J, que indican el origen andino de los materiales (Cattan-Toupance *et al*., 1998).

En cuanto a los marcadores RAPD sólo el 23% de los "primers" probados generaron bandas polimórficas, con un promedio de una banda polimórfica por "primer". Los "primers" RAPD generaron fingerprints únicos que permitieron diferenciar el 37% de los individuos de las distintas muestras. Cattan-Toupance *et al*. (1998) empleando marcadores RAPD observaron sólo un 9% de "primers" polimórficos que generaron un promedio de 1,4 bandas polimórficas por "primer".

En estudios previos, la técnica de ISSR demostró gran robustez y reproducibilidad en la caracterización de muestras de poroto común y resultó ser complementaria de RAPDs, al revelar mayor polimorfismo entre porotos de diferente origen (Galván *et al*., 2003; González *et al*., 2005).

En el análisis de los porotos silvestres empleando la técnica de ISSR sólo el 40% de los "primers" ISSR generaron bandas polimórficas, en base a los cuales se

diferenció al 67% de los individuos, obteniéndose 21 patrones únicos de amplificación. Estos presentaron 4 bandas polimórficas por "primer" superando a los marcadores RAPD, a pesar de que el número de "primers" ISSR ensayados fue menor (ISSR=10 "primers", RAPDs=26 "primers").

Los "primers" ISSR generaron un mayor porcentaje de bandas polimórficas (36%) que los "primers" RAPD (15%). Esto no hace más que confirmar que los "primers" ISSR detectaron con mayor eficiencia los polimorfismos que los RAPD, lo que también se observó en análisis de la diversidad de los porotos cultivados (Galván *et al.*, 2003).

Entre los "primers" ISSR, los que presentaron secuencias de dinucleótidos repetidas, principalmente con anclaje 3' y sin anclaje, generaron patrones de amplificación más complejos y por lo tanto informativos. Los "primers" con dinucleótidos amplificaron un total de 11 bandas polimórficas con un promedio de 4 bandas polimórficas por "primer", mientras que el "primer" con trinucleótidos generó 6 bandas que mostraron polimorfismo. Estos resultados estarían sugiriendo la presencia de una alta frecuencia de microsatélites de di y trinucleótidos dispersas en el genoma del poroto común. Yu *et al.* (1999) observó que las repeticiones de dinucleótidos son secuencias útiles para revelar regiones de microsatélites polimórficas en el genoma del poroto. Más aún, en el genoma de maíz, soja y arroz también se encontró que los dinucleótidos son las repeticiones más polimórficas (Rongwen *et al.*, 1995; Akagi *et al.*, 1996; Chin *et al.*, 1996).

Análisis de agrupamientos y de coordenadas principales.

Los fenogramas obtenidos a partir de los datos de RAPD e ISSR empleando distintos coeficientes (Simple Matching y Jaccard) y los resultados de correlación entre las matrices de similitud y las diferencias de alturas y distancias geográficas entre los sitios de recolección, señalan que existe mayor similitud genética entre individuos procedentes de áreas geográficas próximas, de modo que se corrobora la hipótesis de estructuración geográfica de las poblaciones silvestres de poroto, comprobada para otras áreas de América (Gepts *et al.*, 1986: Debouck, 2000; Santalla *et al.*, 2003; Chacón 2005).

Cuando se emplearon marcadores ISSR los grupos se discriminaron mejor que con RAPD. Los árboles de Neighbor Joining (NJ) muestran patrones de agrupamiento similares a los fenogramas y en ellos se puede observar además la gran divergencia genética de algunos individuos, evidenciada por una mayor longitud de las ramas del árbol. En los gráficos correspondientes al Análisis de Coordenadas los grupos no están claramente delimitados.

Los principales grupos de muestras que aparecen en los análisis de agrupamientos corresponden a las tres provincias estudiadas, Salta, Jujuy y Tucumán, habiendo mayor similitud entre individuos de estas dos últimas provincias. La mayoría de los individuos de Salta forma parte de un mismo grupo del fenograma con ISSR, excepto el individuo S1c, que también aparece aislado con RAPD y en los resultados de todas las técnicas empleadas.

Las muestras de Tucumán forman un grupo con ambos marcadores y en todos los resultados (fenogramas SM y J, y árbol de NJ) pero con RAPD los individuos no se diferencian entre sí, en cambio con ISSR la mayoría de ellos está bien diferenciado. Las muestras de Jujuy forman un grupo algo disperso cuando se emplean marcadores RAPD y está mejor definido con ISSR.

La similitud genética entre las muestras silvestres de Tucumán y Jujuy se debería a causas geográficas y ecológicas, ya que proceden de áreas con similar latitud y altitud, que son diferentes a las de aquéllas de las muestras de Salta. La mayoría de los individuos de las muestras de Jujuy y Tucumán provienen de sitios localizados entre 1300 y 1800 msnm, y 23 y 27º de latitud Sur; los de Salta, en cambio, proceden de sitios localizados entre 2300 y 2600 msnm, a 22º 15` de latitud Sur.

Los sitios de recolección de las muestras de Tucumán y Jujuy corresponden a las provincias fitogeográficas de la Prepuna, la Selva Montana y el Chaco, en tanto que las muestras de Salta corresponden a Pastizales de Neblina. Cattan-Toupance *et al.* (1998) en un estudio genético de porotos silvestres del NOA también observó que existe mayor similitud entre muestras procedentes de Tucumán y Jujuy, que con aquéllas de Salta.

El área de origen de los materiales de Salta se encuentra más aislada e inaccesible que las restantes. Prueba de esto es que para llegar a la localidad de Los Toldos, en el departamento de Santa Victoria, se debe acceder por Bolivia, para lo cual es necesario cruzar el río Bermejo. Posiblemente este aislamiento geográfico es lo que permitió el desarrollo de individuos con combinaciones genéticas no encontradas en otras localidades (haplotipos únicos). El agrupamiento de los individuos de Santa Victoria es probablemente el resultado de una fuerte subdivisión poblacional ocasionada por el aislamiento geográfico. Santalla *et al.* (2003) propusieron que el aislamiento geográfico es una de las principales causas de diferenciación genética entre poblaciones de poroto común en la Argentina. También es posible que debido al pequeño tamaño de las muestras estudiadas su diferenciación genética esté sobreestimada.

El aislamiento ecogeográfico de algunas poblaciones habría conducido al mantenimiento de genotipos y morfologías distintivas de cada área (Mumba y Galwey, 1998). A pesar de este relativo aislamiento, cierto grado de fecundación cruzada sumado al flujo génico entre poblaciones cercanas habría mantenido la variabilidad intrapoblacional observada en las poblaciones silvestres de porotos del NOA.

A modo de síntesis cabe señalar que el análisis conjunto de los resultados obtenidos con los marcadores RAPDs e ISSR permitió apreciar niveles levemente diferentes de similitud y agrupamiento de las muestras según la técnica empleada. Esto podría atribuirse a las diferencias que existen entre los dos tipos de marcadores con respecto a las secuencias de los "primers", que les permitiría acceder a la amplificación de diferentes regiones del genoma. En el análisis de clusters realizado empleando los marcadores ISSR el agrupamiento de los individuos por provincia de origen fue mas claro que con los RAPD. Con la técnica de ISSR se observó un menor número de individuos que no formaron parte de los clusters principales comparado con los RAPDs. Esta mayor consistencia en el agrupamiento sugiere que los marcadores ISSR estarían identificando sitios del genoma conservados en cada región geográfica, sin dejar de ser eficientes para identificar individuos.

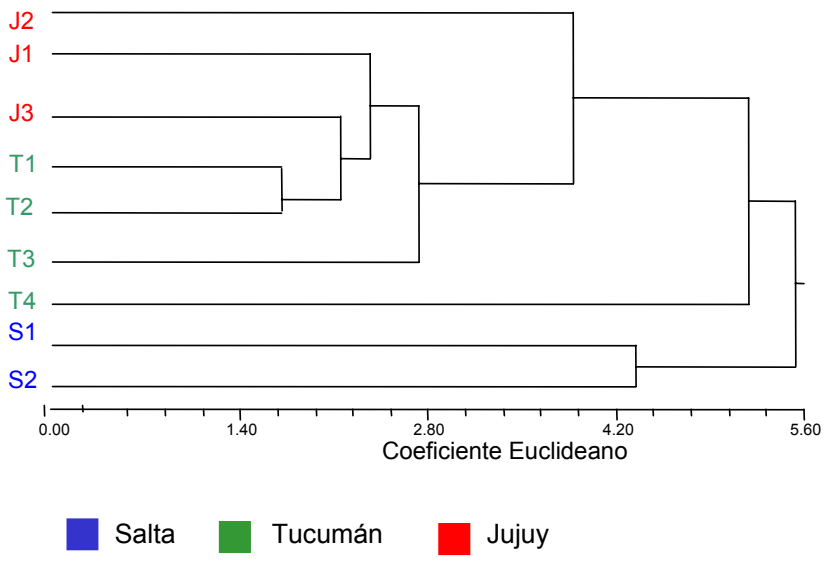
Los resultados obtenidos a partir de los análisis moleculares son congruentes con aquellos del análisis de datos morfológicos (Figura 2.27; Tabla 2.Q), donde se observa que las muestras de Jujuy y Tucumán forman un cluster separado a gran distancia de las muestras de Salta (Menéndez Sevillano, 2002). Mediante el análisis de componentes principales empleando los datos morfológicos (Ver Anexo 5, pág. 181) se pudo determinar que los caracteres que contribuyen a la diferenciación de las muestras de Salta en el primer componente principal son el largo, ancho, y

grosor de la vaina; en el segundo componente el largo de hojas y ancho de las semillas y en el tercer componente el peso de 100 semillas y ancho de hojas.

Tabla 2.Q. Caracteres morfoagronómicos de muestras poblacionales de porotos silvestres del Noroeste Argentino. Cada valor representa el promedio de diez plantas (Menéndez Sevillano, 2002).

Código de entrada		Madurez Total	semilla			Peso de 100 semillas	hoja		vaina		
		(días)	largo (mm)	ancho (mm)	grosor (mm)	(g)	largo (mm)	ancho (mm)	largo (mm)	ancho (mm)	grosor (mm)
J1	VAV-6362	169	8.64	5.26	2.91	11.0	51.5	27.6	78.4	7.2	6.3
J2	VAV-6363	165	7.62	5.03	2.86	9.0	43.3	21.4	76.1	6.8	6.1
J3	VAV-6366	168	7.85	4.91	2.93	10.0	42.3	21.4	69.9	6.1	5.3
S1	VAV-6364	148	5.27	5.63	3.74	13.0	34.6	18.2	89.4	7.4	5.7
S2	VAV-6365	134	7.71	5.16	2.90	14.0	36.5	17.6	86.0	7.4	6.4
T1	VAV-6368	150	7.70	4.80	2.84	9.0	41.2	20.9	72.9	6.4	5.2
T2	VAV-6369	150	7.48	4.68	2.78	10.0	33.4	16.5	78.0	6.7	4.7
T3	VAV-6370	168	7.05	4.59	3.03	11.0	34.0	15.9	74.3	7.0	4.2
T4	MCM-146	150	7.40	4.66	2.47	7.0	59.0	37.0	57.4	7.2	4.1

Figura 2.27. Fenograma de nueve muestras de porotos silvestres empleando caracteres morfoagronómicos (CCC= 0.87).



Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA).

En el análisis de la varianza molecular (AMOVA) de los patrones de amplificación, el número de haplotipos identificados con RAPD fue menor que los identificados con ISSR (16 y 21 haplotipos respectivamente, Tabla 2.P). La mayoría de los individuos (67%) mostraron patrones de amplificación únicos con los marcadores ISSR, revelando una gran variabilidad intramuestra. Por otro lado, los marcadores RAPD permitieron reconocer un total de 16 haplotipos, e identificar el 37% de los individuos con patrones únicos.

La subdivisión poblacional revelada en el AMOVA fue significativa entre provincias, con 13,29% de la varianza total con RAPD y 41,46% con ISSR, lo que coincide con los resultados obtenidos mediante análisis de clusters y de Coordenadas Principales, donde los ISSR permitieron separar mejor las muestras por provincia de origen que los RAPD. Por otro lado, el componente de la varianza dentro de las povincias fue el que mostró mayores valores (RAPD= 86,71%, ISSR= 58,54%). El AMOVA reveló que más del 58% de la variabilidad observada con los marcadores moleculares resultó de diferencias a nivel de ADN entre individuos de muestras de una misma provincia, más que a diferencias entre muestras de diferentes provincias. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados por Cattan-Toupance *et al*. (1998) quienes demostraron que existe gran variabilidad intrapoblacional (RAPD= 67,5% de la varianza total; Φ_{st}=0,325). Papa y Gepts (2003) observaron una clara estructura geográfica de la diversidad genética de materiales silvestres y una fuerte diferenciación interpoblacional, aún a cortas distancias, en poblaciones naturales predominantemente autógamas. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, a pesar de la supuesta autogamia estricta de

Phaseolus vulgaris, hay evidencias de que tanto en variedades cultivadas como silvestres existe una gran variabilidad en el sistema reproductivo que permite el intercambio genético entre poblaciones y además sería afectado por las condiciones ecológicas (Ibarra-Pérez *et al.*, 1997; Hoc *et al.*, 2001). Las tasas más bajas de fecundación cruzada reportadas son suficientes para generar amplia variabilidad genética a lo largo de cientos o miles de años (Beebe *et al*., 1997). Por esta razón es posible que se haya producido un flujo génico entre poblaciones próximas que ha conducido a diferentes patrones de variación en lugares geográficos distantes y aislados por la orografía del NOA (Menéndez Sevillano, 2002).

Finalmente cabe consignar que futuros muestreos para la preservación de los recursos genéticos de porotos silvestres deberían comprender todas las provincias fitogeográficas del NOA donde crece *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus*, en forma estratificada (tomando diferentes alturas) y seleccionando varias poblaciones en cada sitio. De este modo se podrá recuperar todo el espectro de la variabilidad presente, que como ha quedado demostrado en el caso de Santa Victoria (Salta) puede ser muy amplio.

CONCLUSIONES

✓ El patrón de distribución de la variabilidad genética de las muestras poblacionales de porotos silvestres de *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* estudiadas se asocia con la distribución geográfica de las mismas. Se observó una subdivisión significativa a nivel latitudinal y de altitud. Por ejemplo, las muestras de Santa Victoria (Salta) recolectadas en los Pastizales de Neblina de la provincia fitogeográfica de las Yungas, entre 2300 y 2600 msnm, se separan de las restantes procedentes de zonas más bajas (1300-1900) de Tucumán y Jujuy, correspondientes a las provincias fitogeográficas del Chaco, la Prepuna y las Yungas (Selva Montana).

✓ Las muestras de Jujuy y Tucumán demostraron ser genéticamente más afines entre si que con las de Salta, lo que coincide con lo observado empleando caracteres morfoagronómicos.

✓ El aislamiento geográfico favorecido por la topografía del NOA habría conducido al mantenimiento de genotipos y morfologías distintivas de cada ecoregión, y la fecundación cruzada sumada al flujo génico entre poblaciones cercanas habría mantenido la variabilidad intrapoblacional observada.

✓ Las tres metodologías empleadas (faseolinas, RAPD e ISSR) permiten analizar diferentes aspectos que hacen a la diversidad de las muestras. Mientras que la electroforesis de proteínas de reserva permite establecer el acervo génico de

los materiales estudiados, los marcadores RAPD e ISSR contribuyen a detectar diferencias a nivel de grupos de muestras, de muestras y de individuos.

✓ Los ISSR demostraron ser más eficientes que los RAPD para agrupar individuos según su provincia de origen y para caracterizar a dichos individuos, probablemente debido a la naturaleza de las secuencias amplificadas. El mayor número de bandas polimórficas amplificadas por los "primers" ISSR permitió generar haplotipos únicos para los distintos individuos, que además facilitaron su agrupamiento de acuerdo con el área geográfica de procedencia.

✓ La variabilidad observada sugiere que los materiales silvestres de porotos del NOA serían de gran utilidad en los programas de mejoramiento para ampliar la base genética de los cultivares.

CAPÍTULO 3

Análisis de la variabilidad genética de poblaciones primitivas de *Phaseolus vulgaris*

INTRODUCIÓN

En los valles altos del Noroeste Argentino, donde durante miles de años se cultivó el poroto, aún se practica una agricultura primitiva, basada en una gran diversidad de variedades locales tradicionales o “landraces”, que se han mantenido en las huertas familiares a través de los años y cuyas semillas formaron parte de la dieta de los pobladores indígenas de la zona (Menéndez Sevillano, 2002). Estos cultivares se obtuvieron por selección masal, que es un método de mejoramiento primitivo practicado por los agricultores en las pequeñas huertas y valles aislados. El procedimiento consiste en elegir los mejores individuos y con una mezcla equilibrada de sus semillas obtener la siguiente generación, repitiéndose el proceso durante varias generaciones. La selección de plantas con características beneficiosas para el hombre (semillas más grandes, tallos más fuertes, vainas más firmes, etc.) crea una fuerte presión de selección que resulta en la obtención de variedades distintas en cada sitio fundamentalmente debido a las diferencias ambientales entre estos sitios, los materiales de partida y los distintos gustos y criterios de selección de las poblaciones humanas (Cubero, 1999). Este tipo de selección resultó en la obtención de razas o variedades locales (primitivas o “landraces”), que son probablemente las más diversas de las plantas cultivadas (Frankel *et al.*, 1995). Por ejemplo, la existencia de cultivos de poroto con semillas de diferentes colores de tegumento, es el resultado del sistema de manejo usado por los aborígenes desde épocas remotas, que además aseguró una mayor plasticidad del cultivo, proporcionándole mayor capacidad de respuesta ante potenciales condiciones adversas y asegurando una mayor cosecha (Figura 3.1).

Figura 3.1. Variabilidad observada en las poblaciones primitivas de poroto común *Phaseolus vulgaris* L.

La diversidad genética existente entre y dentro de las poblaciones primitivas de poroto las convierte en una valiosa fuente de genes para el desarrollo y mantenimiento de nuevas variedades. Las poblaciones primitivas de porotos muestran diferencias con las actuales variedades comerciales de poroto común de América y Europa principalmente en la morfología de la semilla y en aquellos caracteres relacionados con la adaptación del cultivo a zonas templadas (Menéndez Sevillano, 2002). Por lo tanto, el cultivo de estas poblaciones en el NOA representa una forma de conservación *in situ* de germoplasma. La conservación *in situ* de los cultivos ocurre en determinadas áreas o hábitats, por ejemplo en los campos de los pequeños agricultores, donde las especies o variedades han evolucionado en su entorno ecológico conservando sus características distintivas (De Ron *et al*., 2004). La conservación de los recursos fitogenéticos en el lugar donde éstos han evolucionado y/o han sido seleccionados por generaciones de agricultores, es el mecanismo que favorece el incremento de la variabilidad y diversidad de las especies, poblaciones y genes en la naturaleza. La conservación *ex situ* es

complementaria a la *in situ* y cumple un papel indiscutible en el mejoramiento genético tradicional y la investigación, dado que es imprescindible disponer de colecciones de recursos fitogenéticos para los trabajos científicos.

Figura 3.2. Cultivo de variedades primitivas de poroto común *Phaseolus vulgaris* L. en la provincia de Salta.

Variabilidad genética en los porotos primitivos

Igual que en el caso de los porotos silvestres, las razas locales o poblaciones primitivas de poroto presentan dos acervos génicos principales, el Mesoamericano y el Andino, diferenciados en base a caracteres morfológicos (Singh *et al*., 1991a), proteínas de reserva de la semilla (Gepts y Bliss, 1988), isoenzimas (Singh *et al*.,

1991b) y marcadores moleculares (Nodari *et al*., 1992; Beebe *et al.*, 2001; Chacón *et al.*, 2005; Blair *et al.*, 2006).

Debido a que el poroto común es una especie predominantemente autógama, las poblaciones primitivas de porotos consisten en gran parte en mezclas de líneas puras. La diversidad observada en dichas poblaciones se debe a la respuesta a factores ecológicos y antropogénicos responsables de la existencia y estabilidad de las mismas, lo que podría garantizar la capacidad de adaptación de las variedades a cambios ambientales. Por ejemplo, una diferencia en el número de días en la germinación podría constituir una ventaja, ya que el período de lluvias en la época de siembra del poroto en las zonas altas del NOA es incierto, por lo tanto diferentes tasas de germinación asegurarían la supervivencia de la media de la variedad mezcla (De Ron *et al.*, 2004).

La diversidad observada en las poblaciones de porotos primitivos del NOA es una consecuencia de la evolución de la especie, con posterioridad a su domesticación y a su coexistencia con poblaciones silvestres (Menéndez Sevillano, 2002). La selección de los porotos con fines alimenticios y estéticos habría jugado un papel relevante en su evolución. Las poblaciones primitivas habrían sido domesticadas en la época precerámica, antes de la existencia de utensilios para la cocción de las semillas, por lo que la selección de los porotos con fines estéticos, ornamentales y como juguete para los niños, en un principio habría dado como resultado cultivares mezcla con una amplia variación en el color y en los patrones de manchas de la semilla, la que además contendría altos niveles de factores antinutricionales (productos del metabolismo secundario de la planta, como fenoles y lectinas, que impiden la digestión y absorción de nutrientes en animales y en el hombre)(Beebe *et al.*, 1997). A pesar de ello, la selección de poroto para consumo también debe ser considerada como un factor evolutivo importante. La gran

variabilidad observada en el tamaño de las semillas y de las vainas se debe a que el consumo de vainas verdes (chauchas) en ensaladas es una costumbre difundida en el NOA y también a que en esa zona el poroto es un componente esencial de platos tradicionales como el "locro", que utiliza porotos blancos y de otros colores de diferentes tamaños (De Ron *et al.*, 2004).

La variabilidad genética en las poblaciones primitivas se genera en gran parte por los entrecruzamientos con porotos silvestres. Las formas "weedy" son plantas de poroto que muestran evidencias morfológicas de flujo génico entre porotos silvestres y domesticados, y crecen mezclados en los cultivos de porotos primitivos o en los alrededores de estos cultivos (Papa y Gepts, 2003). Los complejos formados por los tipos silvestres, cultivados y los "weedy" se observaron en varias especies de plantas como maíz (Wilkes, 1977), pimiento (Pickersgill, 1971), papa (Johns *et al.,* 1987) y lima bean (*P. lunatus* L.; Debouck *et al.*, 1987). En *P. vulgaris* estos complejos se observaron en la zona andina (Debouck *et al*., 1989, Beebe *et al.*, 1997; Menéndez Sevillano, 2002; De Ron *et al.*, 2004) y en México (Delgado Salinas *et al*., 1988).

La fecundación que suele ocurrir en los sitios de origen entre los porotos silvestres, cultivados y los tipos "weedy" generan un flujo génico entre los diferentes componentes biológicos del complejo. De esta manera, las formas "weedy" incrementan la diversidad y pueden además aportar a la variabilidad genética, en relación a los tipos silvestres y domesticados. Un flujo genético continuo entre los distintos tipos, generado repetidamente a lo largo del tiempo, podría resultar en híbridos que pueden evolucionar hacia formas silvestres bajo la presión de la selección natural (regresión o de-domesticación). Alternativamente, la presión de selección ejercida por el hombre directamente sobre el material vegetal o indirectamente mediante modificaciones significativas del ambiente, podría conducir

a la obtención de híbridos que evolucionan hacia la forma cultivada. En Perú y Colombia se observaron amplias zonas de simpatría entre porotos silvestres y cultivados con complejos "wild-weedy-cultivated" (Beebe *et al*., 1997).

Las condiciones ambientales en las provincias de Salta, Tucumán y Jujuy son apropiadas para el crecimiento de distintas variedades de porotos silvestres y primitivos (Ver Anexo 4, página 181) y para el surgimiento de complejos "wild-weedy-cultivated", algunos de los cuales han sido descriptos por Menéndez Sevillano (2002) y De Ron *et al.* (2004). Sin embargo muchas de estas poblaciones están en peligro de extinción debido a las presiones de explotación forestal y pastoreo existentes en la zona.

Existen diversas situaciones que conducen a la pérdida de los complejos "wild-weedy-cultivated" y de la variabilidad que ellos pueden generar. En sistemas de agricultura de subsistencia los agricultores generalmente cultivan mezclas de granos y los consumen sin discriminar el color de las semillas. En este sistema los tipos de grano raros, resultantes de hibridaciones casuales, no son eliminados y se consumen al igual que algunos porotos silvestres como alimento de emergencia (Beebe *et al.*, 1997). Por eso una agricultura de subsistencia conduce a la preservación de los complejos "wild-weedy-cultivated" que incluyen formas silvestres, cultivadas y "weedy" y los híbridos generados. A medida que el agricultor orienta su producción al mercado, limita el autoconsumo, existiendo entonces una tendencia a cultivar un número reducido de tipos de poroto habitualmente comerciales según la demanda, por lo que los granos fuera de tipo son descartados y en consecuencia el cultivo de variedades mezcla es abandonado.

En la última década, en la zona de Santa Victoria (Salta) se observó una disminución en los tipos de variedades primitivas que se cultivan, lo que probablemente es el resultado de un cambio en las costumbres de los pobladores

(Menéndez Sevillano, 2002). Muchos agricultores migran hacia el sur de la provincia de Salta para participar de la cosecha de caña de azúcar y por ello dejan sus tierras en la época de siembra del poroto, lo que hace que sólo cultiven algunos tipos de porotos, únicamente con fines ceremoniales y para juego de los niños. A esto se suma la restricción progresiva del hábitat de los porotos silvestres a suelos marginales y condiciones topográficas inadecuadas para la agricultura, el avance de la deforestación y el pastoreo, y la desaparición de las poblaciones silvestres por el uso de herbicidas o prácticas de cultivo mejoradas.

Singh *et al.* (1991a), Sonnante *et al.* (1994) y Beebe *et al.* (2001) estudiaron un número reducido de poblaciones de porotos primitivos del NOA y encontraron una baja variabilidad genética, lo que sugiere la necesidad de ampliar la base genética de las variedades domesticadas. De Ron *et al*. (2004) analizaron 83 entradas de porotos primitivos del NOA mediante caracteres morfológicos y demostraron que existe una gran variación fenotípica en pequeñas áreas. Algunas líneas muy heterogéneas se denominaron poblaciones mezcla o complejas, cuya variabilidad se mantendría por el flujo génico con las poblaciones silvestres que crecen próximas. En base a ello señalaron la importancia de aprovechar esta variabilidad en los programas de mejora. Sin embargo, a pesar de la considerable variación encontrada con respecto al tipo de semilla se observó cierta uniformidad genética en base a marcadores bioquímicos (faseolinas e isoenzimas) (Santalla *et al*., 2003). Por otro lado, Beebe *et al.* (1997) sugirieron que el análisis morfológico de las poblaciones silvestres y primitivas, como también el de los complejos de hibridación que forman, debe ser acompañado por un análisis a nivel de ADN, lo que permitirá determinar la contribución de dichos complejos a la variabilidad de los porotos domesticados y ayudará a establecer prioridades de conservación.

El objetivo de este capítulo es analizar la variabilidad genética existente en diez muestras poblacionales de porotos primitivos (*Phaseolus vulgaris* L.) del Noroeste Argentino, recolectadas en diferentes sitios de las provincias fitogeográficas de las Yungas y de la Prepuna, a distintas alturas. Se emplearon para ello marcadores bioquímicos (Faseolinas) y moleculares (RAPD e ISSR), cuyos resultados se analizaron mediante tres técnicas (UPGMA, Análisis de Coordenadas Principales y Neighbor Joining).

Las preguntas a responder en éste capítulo son las siguientes:

- ¿Existe estructuración geográfica de la variabilidad genética de las poblaciones o grupos de poblaciones de porotos primitivos como se observó en los porotos silvestres?
- ¿La variabilidad genética de las poblaciones primitivas es baja como lo sugieren algunos estudios previos?
- ¿Cuál es la eficiencia de los diferentes marcadores genéticos utilizados para caracterizar las poblaciones de porotos primitivos del NOA?
- ¿Existe congruencia entre los resultados del agrupamiento de las muestras poblacionales basado en datos morfológicos con el que resulta de los estudios moleculares?

Material biológico

Se trabajó con 10 muestras poblacionales de porotos primitivos (*Phaseolus vulgaris* L.) provenientes de la colección del Banco de germoplasma del Laboratorio de Recursos Fitogenéticos "N. I. Vavilov" de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

Las muestras provienen de tres departamentos de las provincias de Salta y Jujuy, ubicadas entre los 2400 y 3000 msnm, los 22° y 24° S, y los 66° y 64° O (Tabla 3.A). Las muestras de porotos primitivos consistieron en mezclas de semillas con colores de tegumento diferentes, y se le asignó a cada una un código de entrada en el banco de germoplasma (Figura 3.4).

En la Figura 3.3 se indica la ubicación geográfica de los sitios de recolección. Estos corresponden a las localidades de Iruya y Santa Victoria (Salta) pertenecientes al Distrito de Pastizal de Neblina en la provincia fitogeográfica de las Yungas; y a la localidad de Tilcara (Jujuy) de la provincia fitogeográfica de la Prepuna.

Tabla 3.A. Sitios de recolección de las muestras poblacionales de porotos primitivos (*Phaseolus vulgaris* L.) estudiadas.

N[a]	Código de entrada	Pro-vincia	Departa mento	Prov. Fitog.[b]	Distrito Fitog.	Altitud msnm	Latitud S	Longitud O
s1	VAV-5867	Salta	Santa Victoria	Y	Pastizal de Neblina	2500	22° 15’	64° 58’
s2	MCM-18	Salta	Santa Victoria	Y	Pastizal de Neblina	2400	22°15’	64°58’
s3	MCM-79-A	Salta	Santa Victoria	Y	Pastizal de Neblina	2400	22°15’	64°58’
i1	VAV-3716-G	Salta	Iruya	Y	Pastizal de Neblina	2900	22°50’	65°14’
i2	VAV-3716-T	Salta	Iruya	Y	Pastizal de Neblina	2900	22°50’	65°14’
i3	VAV-3716-U	Salta	Iruya	Y	Pastizal de Neblina	2900	22°50’	65°14’
i4	MCM-69-A	Salta	Iruya	Y	Pastizal de Neblina	2900	22°50’	65°14’
i5	MCM-109	Salta	Iruya	Y	Pastizal de Neblina	2900	22°50’	65°14’
i6	MCM-110	Salta	Iruya	Y	Pastizal de Neblina	2900	22°50’	65°14’
j1	VAV-5674-D	Jujuy	Tilcara	P	Prepuna	2400	23°34’	65°22’

[a]Nomenclatura. [b]Provincia Fitogeográfica: Y, Provincia de las Yungas; P, Provincia de la Prepuna.

Figura 3.3. Sitios de recolección de las muestras de porotos primitivos estudiados.

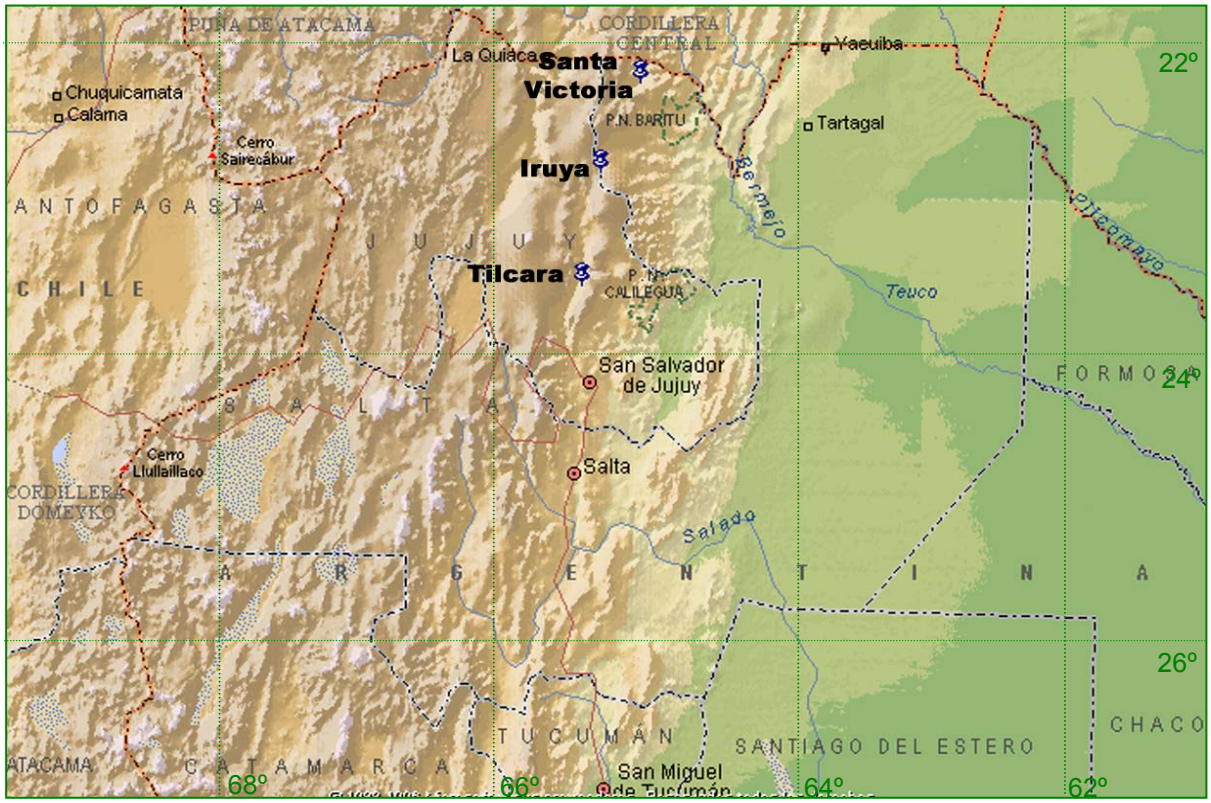


Figura 3.4. Muestras poblacionales de porotos primitivos (*Phaseolus vulgaris*) del Noroeste Argentino. i1: VAV-3716-G, i2: VAV-3716-T, i3: VAV-3716-U, i4: MCM-69-A, i5: MCM-109, i6: MCM-110, s1: VAV-5867, s2: MCM-18, s3: MCM-79-A, j1: VAV-5674-D.

La variabilidad de las muestras se analizó mediante marcadores bioquímicos (faseolinas) y moleculares (RAPD e ISSR).

Los protocolos y "primers" empleados para el análisis de las muestras primitivas mediante análisis de faseolinas, RAPD e ISSR fueron descriptos en el capítulo 2 para el análisis de las muestras silvestres (Ver Materiales y Métodos capítulo 2 página 53). Los resultados se analizaron empleando las técnicas de agrupamientos y ordenación descriptas anteriormente. La correlación entre las matrices de similitud (Simple Matching y Jaccard), las alturas y las distancias geográficas entre los sitios de recolección de las muestras poblacionales se determinó aplicando el test estadístico de Mantel (Mantel, 1967). El análisis de la varianza molecular (AMOVA) se realizó entre localidades utilizando sólo los individuos de Salta, de los departamentos de Iruya (18 individuos) y Santa Victoria (9 individuos), debido a que se contaba únicamente con una muestra de 3 individuos de Tilcara (Jujuy).

Marcadores bioquímicos. Faseolinas

Se analizó el patrón de faseolinas de un total de 5 individuos por muestra. Se observaron los tipos de faseolinas característicos del centro de domesticación Andino. En la Figura 3.5 se presenta un gel de poliacrilamida con los patrones obtenidos para algunas muestras de poroto provenientes de Salta y Jujuy. La variabilidad observada entre y dentro de las muestras analizadas fue muy baja. El tipo de faseolina mas frecuente fue el "T", registrándose el tipo "J" con menor frecuencia (88% y 12%, respectivamente). En la Tabla 3.B se muestran los patrones observados en 5 individuos de cada muestra.

Tabla 3.B. Tipos de faseolina observados en diez muestras de porotos primitivos.

Provincia	Muestra	Faseolinas (en 5 individuos)
Santa Victoria (Salta)	s1	J, T, T, J, T
	s2	T, T, J, T, T
	s3	T, T, T, T, J
Iruya (Salta)	i1	T, T, T, T, T
	i2	T, T, T, T, T
	i3	T, T, T, T, T
	i4	T, J, T, T, T
	i5	J, T, T, T, T
	i6	T, T, T, T, T
Tilcara (Jujuy)	j1	T, T, T, T, T
	TOTAL	2 patrones diferentes

Figura 3.5. Patrones de faseolina de diez muestras de porotos primitivos. M: Marcador de peso molecular; Na y Al: porotos cultivados control variedad Nag12 y Alubia; i y j: muestras; a-e: individuos.

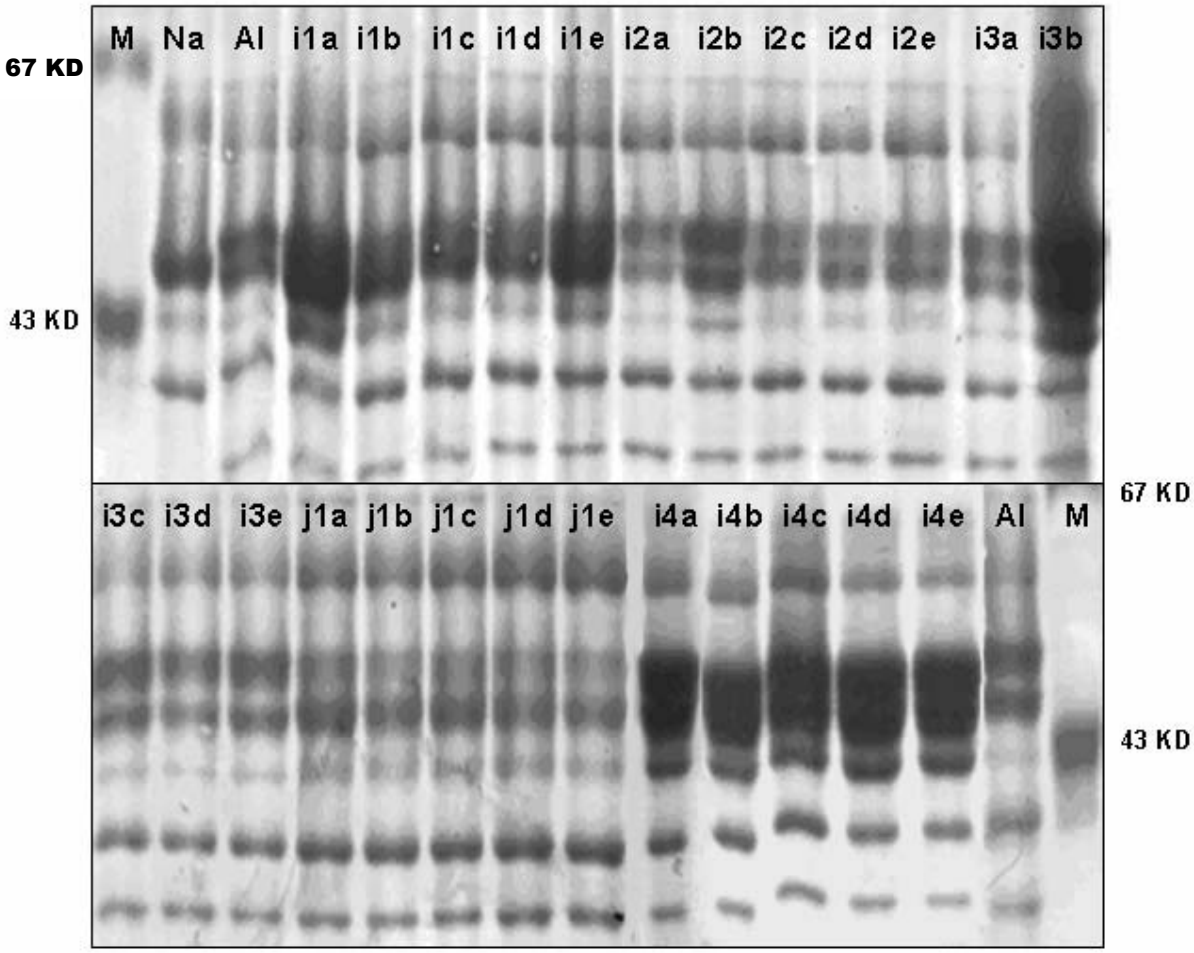
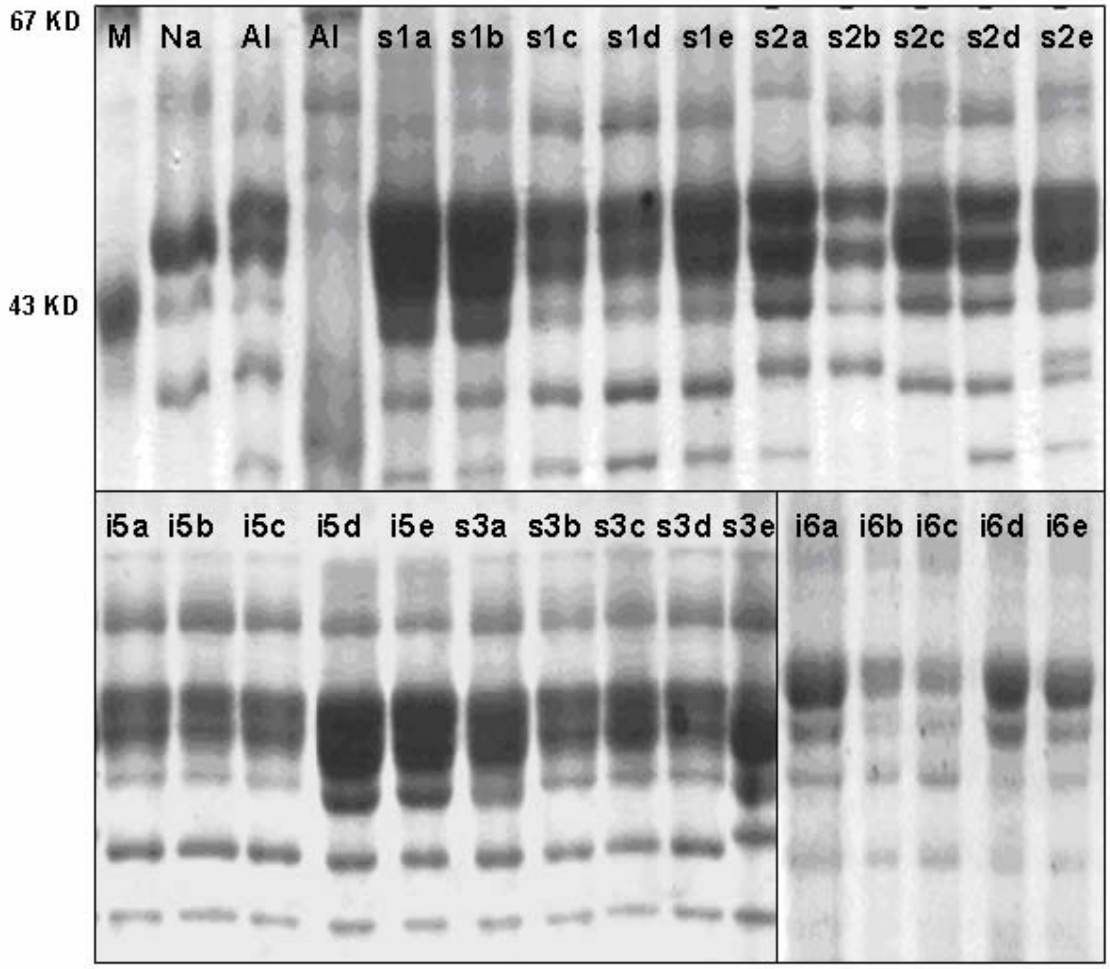


Figura 3.5. (Continuación) Patrones de faseolina de diez muestras de porotos primitivos M: Marcador de peso molecular; Na y Al: porotos cultivados control variedad Nag12 y Alubia; s, i y j: muestras; a-e: individuos.



Marcadores moleculares

Marcadores RAPDS

Bandas polimórficas

De un total de 34 “primers”, 26 mostraron un patrón de amplificación claro para todos los genotipos, sin embargo sólo 4 “primers”, OPA02, OPA20, OPB10 y OPG03 (Figura 3.6), generaron bandas polimórficas. En la Tabla 3.C se presenta un resumen de los resultados de la amplificación.

Tabla 3.C. Productos de amplificación obtenidos con marcadores RAPD a partir del ADN molde de 10 muestras primitivas de *Phaseolus vulgaris*.

Número total de “primers”	26
Número de “primers” polimórficos	4
Total de bandas amplificadas por los “primers” polimórficos	32
Total de bandas polimorficas identificadas	5
Tamaño de las bandas amplificadas	300-2880 pb
Promedio de bandas amplificadas por “primer” polimórfico	8
Promedio de bandas polimórficas	1,25
Porcentaje de bandas polimórficas	16%
Porcentaje de “primers” polimórficos	15%

Las amplificaciones con los “primers” OPA02, OPA20 y OPG03 generaron fragmentos de ADN polimórficos tal cual se puede observar en las figuras 3.7, 3.8 y 3.9. Las amplificaciones revelaron principalmente diferencias dentro de las muestras. Por ejemplo, la amplificación con el “primer” OPA02 generó un total de 9 bandas, una banda de 317 pb está ausente en los individuos de la muestra s2, sin embargo el resto de las bandas amplificadas son monomórficas (Figura 3.7). El “primer” OPA20 permitió amplificar un total de 6 bandas, generando una de 435 pb que sólo se observó en los patrones de amplificación de los individuos de la muestra s2 (Figura 3.8).

Figura 3.6. Amplificación de ADN de muestras de porotos primitivos utilizando 5 "primers" RAPD (Tabla 2.E). M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder; 1: individuo j1a, 2: individuo s1a.

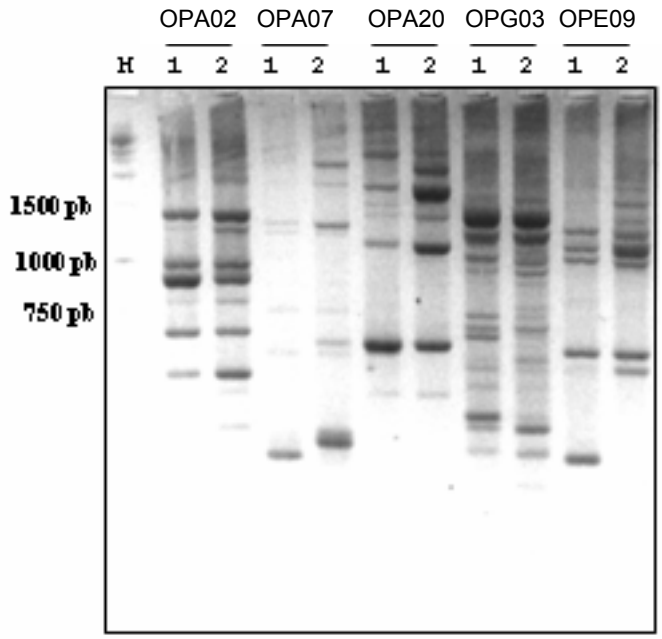


Figura 3.7. Amplificación de ADN de diez muestras de porotos primitivos utilizando el "primer" OPA02. M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder; i, j y s: muestras; a-c: individuos.

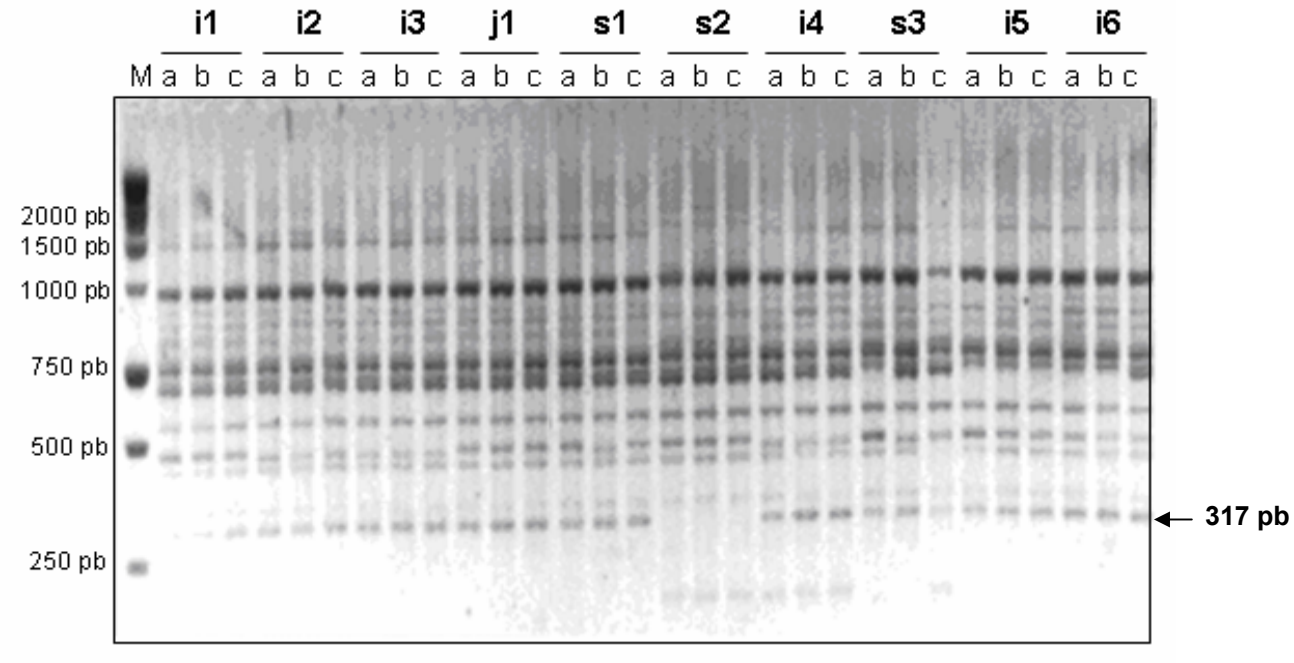


Figura 3.8. Amplificación de ADN de diez muestras poblacionales de porotos primitivos utilizando el "primer" OPA20. M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder; i, j y s: muestras; a-c: individuos.

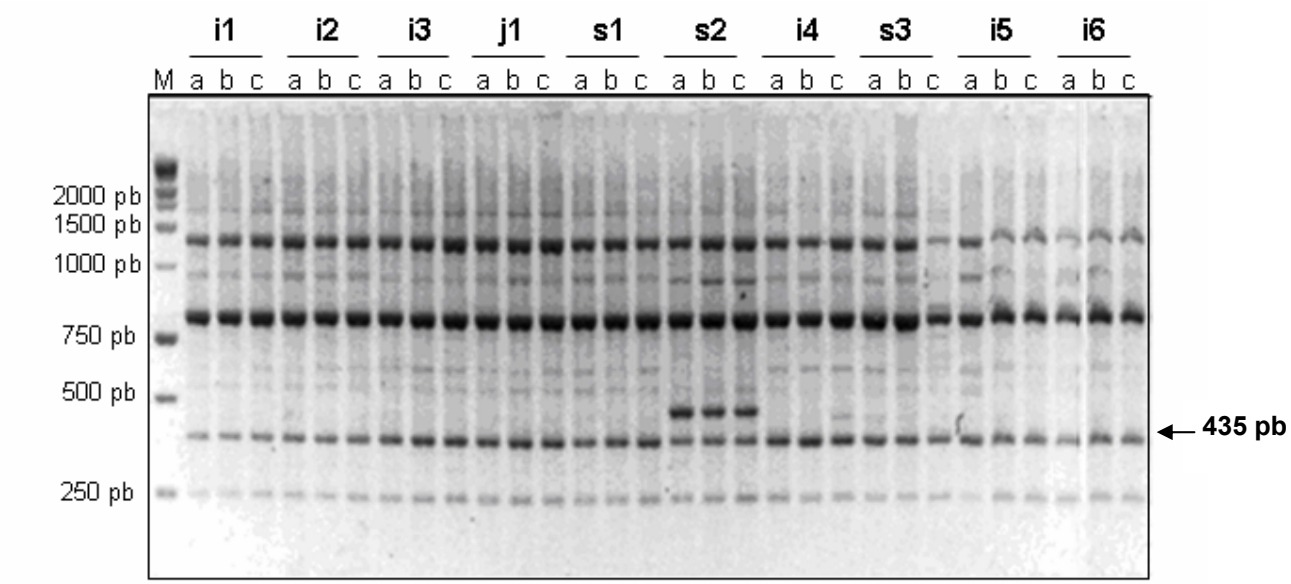
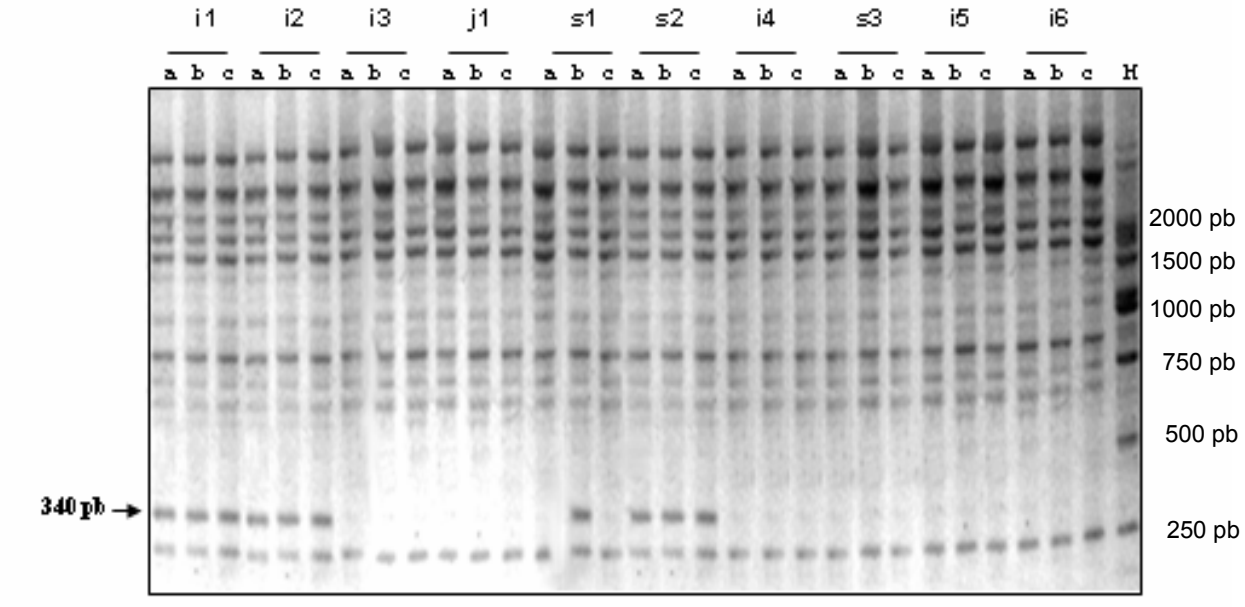


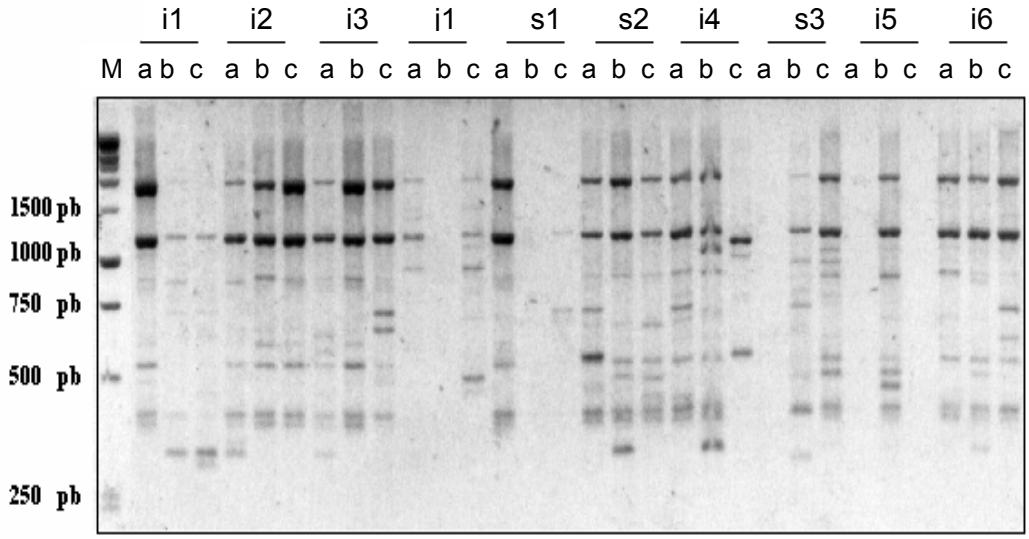
Figura 3.9. Amplificación de ADN de muestras poblacionales de porotos primitivos utilizando el "primer" OPG03. M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder; i, j y s: muestras, a-c: individuos.



Los fragmentos amplificados con el "primer" OPG03 permitieron identificar diferencias entre las muestras por la ausencia de una banda de 340 pb en las muestras i3, i5 y i6 y j1 (Figura 3.9). El "primer" OPB10 amplificó un total de dos bandas polimórficas (Figura 3.10).

Los resultados se confirmaron obteniendo los mismos patrones de amplificación en las repeticiones realizadas con cada uno de los "primers".

Figura 3.10. Amplificación de ADN de diez muestras de porotos primitivos utilizando el "primer" OPB10. **M**: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder. **i**, **j** y **s**: muestras, **a-c:** individuos.



Análisis de agrupamientos y de Coordenadas Principales

A partir de la matriz básica de datos de la Tabla 3.D se construyeron dos matrices de similitud empleando los coeficientes de Simple Matching y Jaccard. Con cada matriz de similitud se construyó un fenograma (Figuras 3.11 y 3.12). Los individuos de la mayoría de las poblaciones se hallan relacionados a valores de similitud muy altos, superiores a 0,70 (SM) y 0,63 (J), y no se observan agrupamientos en función de las localidades o muestras analizadas, a excepción de

los individuos de la muestra s2 de Santa Victoria (Salta) que forman un cluster separado de los restantes con un grado de similitud bajo, de 0,34 para Simple Matching y Jaccard. El resto de las muestras se agrupan en un solo cluster en el que se observan dos subgrupos. Uno formado por las muestras i1, i2, el individuo i5a de Iruya y los individuos s1b y s1c de Santa Victoria. Un segundo subgrupo incluye al resto de las muestras de Iruya, la muestra s3, el individuo s1a de Santa Victoria y la muestra j1 de Tilcara. En el fenograma obtenido con el coeficiente de Simple Matching el individuo i4c forma parte del primer subgrupo, sin embargo con el coeficiente de Jaccard se asocia por fuera de ambos subgrupos a una menor similitud (0,43).

Tabla 3.D. Matriz Básica de Datos obtenida a partir de las amplificaciones de ADN de 30 individuos de muestras de porotos primitivos provenientes de tres localidades del NOA, analizados aplicando la técnica de RAPD. (PR: "primer"; TB: Total de bandas amplificadas; BP: Bandas polimórficas; PM: Peso molecular de las bandas en pb; i, j y s: muestras; a-c: individuos; (-): dato faltante).

				i1			i2			i3			i4			i5		
PR	TB	BP	PM	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
OPA02	9	1	317	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA20	6	1	435	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPB10	7	2	1170	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	-	1	1
			1880	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
OPG03	10	1	340	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	-	0	0	0	0

				i6			s1			s2			s3			j1		
PR	TB	BP	PM	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
OPA02	9	1	317	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
OPA20	6	1	435	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
OPB10	7	2	1170	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
			1880	1	1	1	1	-	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPG03	10	1	340	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	-

Figura 3.11. Fenograma de 30 individuos pertenecientes a muestras de porotos primitivos procedentes de tres localidades del NOA, analizados mediante marcadores RAPD (Coeficiente de similitud de Simple Matching, CCC: 0,85)

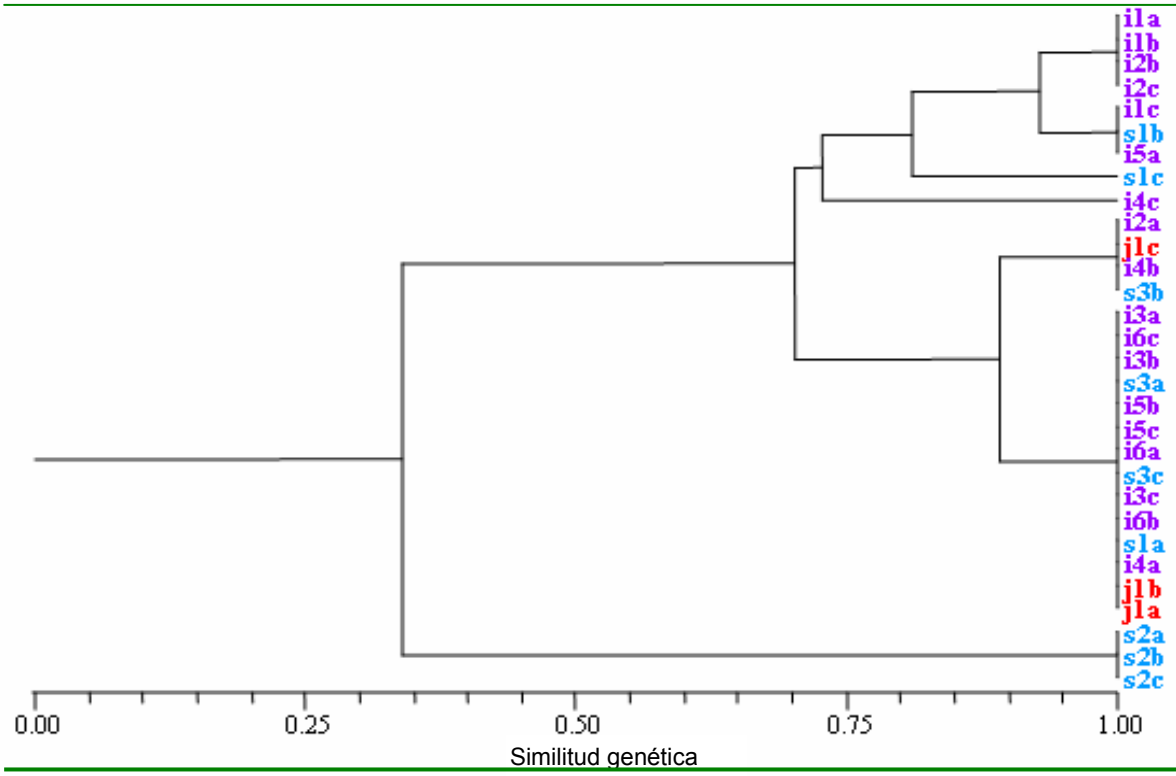
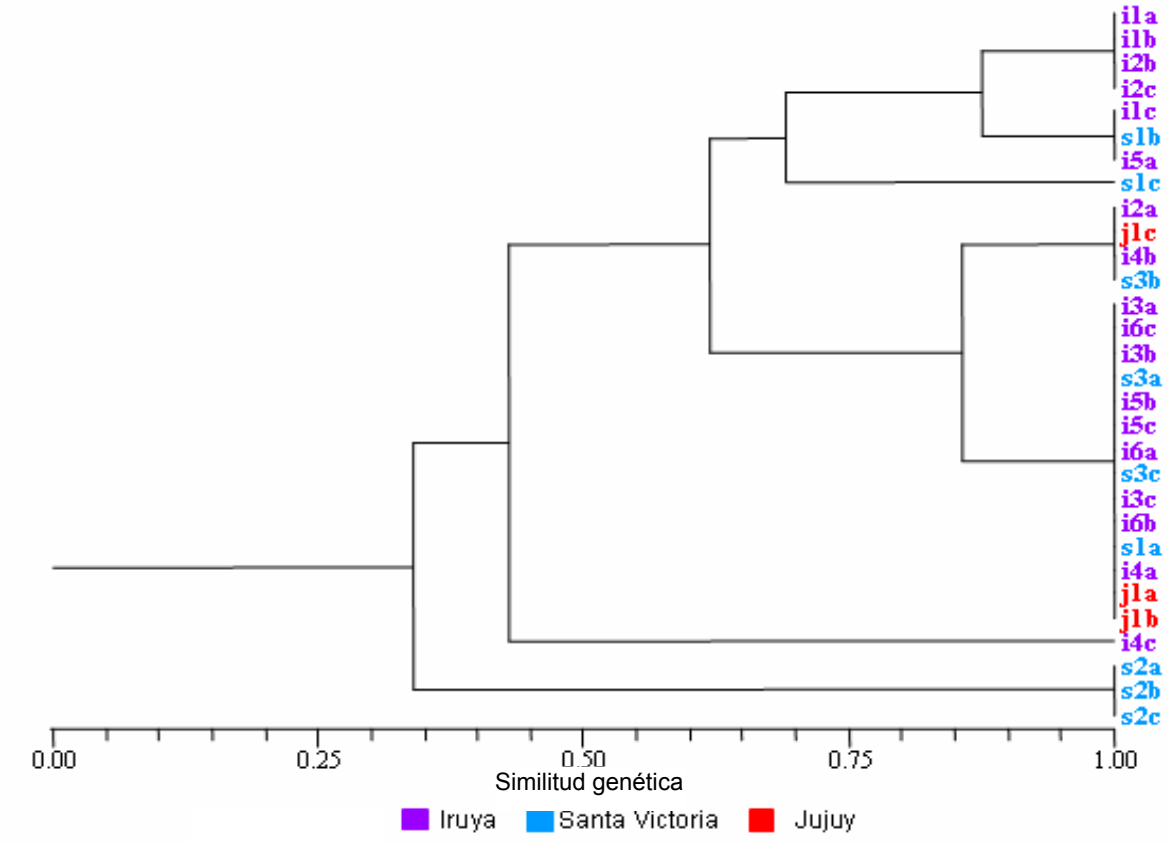


Figura 3.12. Fenograma de de 30 individuos pertenecientes a muestras de porotos primitivos procedentes de tres localidades del NOA, analizados mediante marcadores RAPD (Coeficiente de similitud de Jaccard, CCC: 0,81)



El coeficiente de Simple Matching mostró un rango entre 0,20 y 1 con una media de 0,98. Por otro lado, el coeficiente de Jaccard varió entre 0,01 y 1 con una media de 0,92. Los coeficientes de correlación cofenética (CCC) fueron de 0,85 para el fenograma obtenido con Simple Matching y de 0,81 para Jaccard.

Los resultados obtenidos mediante el Análisis de Coordenadas Principales tampoco mostraron una ordenación de los individuos en función de las localidades o muestras (a excepción de s2 de Santa Victoria), y fueron similares para los diferentes coeficientes de asociación utilizados. En la Tabla 3.E se muestran los eigenvalores, que indican el porcentaje de la variabilidad total expresado en cada coordenada principal.

En las Figuras 3.13 y 3.14 se observan los gráficos de las tres primeras coordenadas principales. En ambas figuras se ve claramente la ordenación de los individuos de la muestra s2 de Santa Victoria agrupados en el cuadrante inferior derecho. La tercera coordenada principal ordena hacia arriba a las muestras i1 e i2 de Iruya, que en el fenograma integraban el primer subgrupo. El gráfico tridimensional muestra un 100% de la variabilidad total observada en las muestras.

Al aplicar el método de ordenación a partir de la matriz de similitud de Jaccard se generó una ordenación similar y las tres primeras coordenadas calculadas acumularon el 98,36% de la variación de los genotipos (Figura 3.14).

Tabla 3.E. Eigenvalores de las primeras cuatro coordenadas principales aplicando los coeficientes de asociación de Simple Matching y Jaccard (CP: Coordenada principal).

CP	Simple Matching			Jaccard		
	Eigenvalor	Porcentaje	Acumulado	Eigenvalor	Porcentaje	Acumulado
1	4.15975097	52.7070	52.7070	4.92667094	51.8658	51.8658
2	2.96026180	37.5086	90.2156	2.93763783	30.9261	82.7919
3	0.95524669	12.1036	> 100%	1.47914879	15.5718	98.3637

Figura 3.13. Análisis de Coordenadas Principales de 30 individuos pertenecientes a muestras de porotos primitivos procedentes de tres localidades del NOA, analizados mediante marcadores RAPD (Coeficiente de similitud de Simple Matching, % de la variabilidad total: 100%)

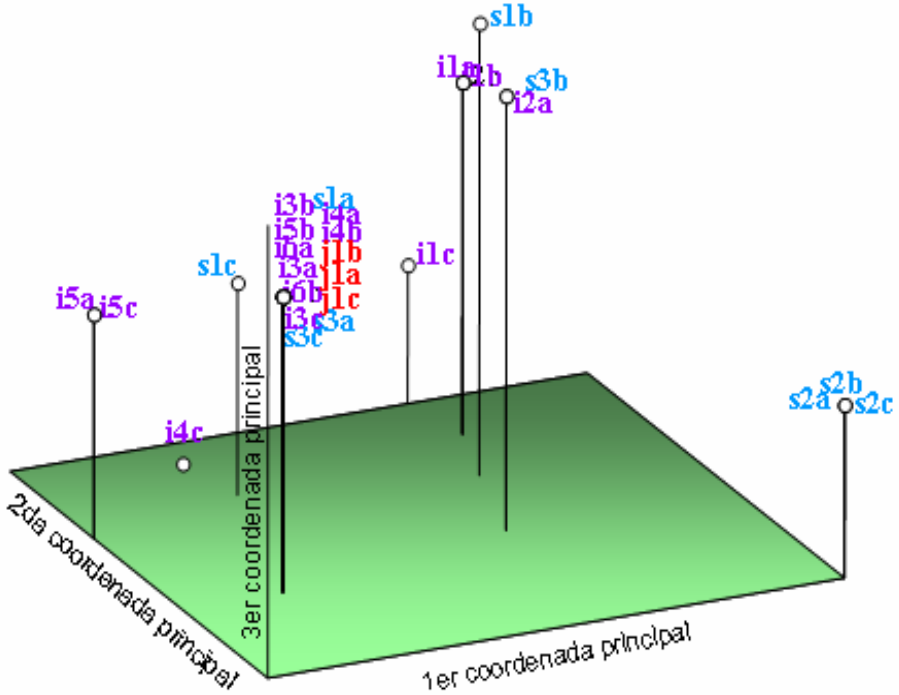
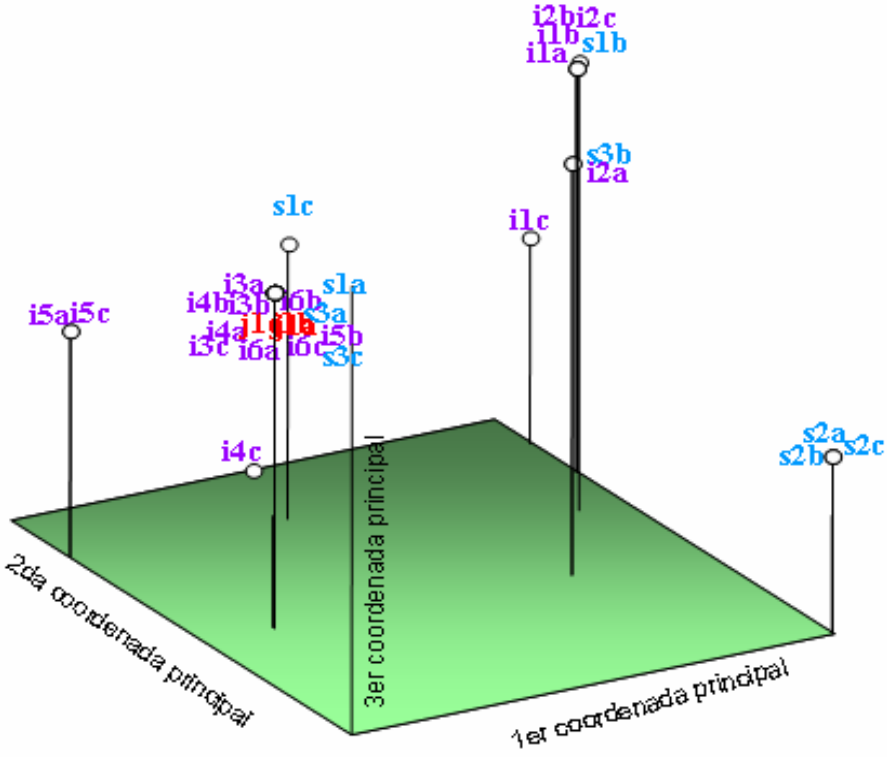
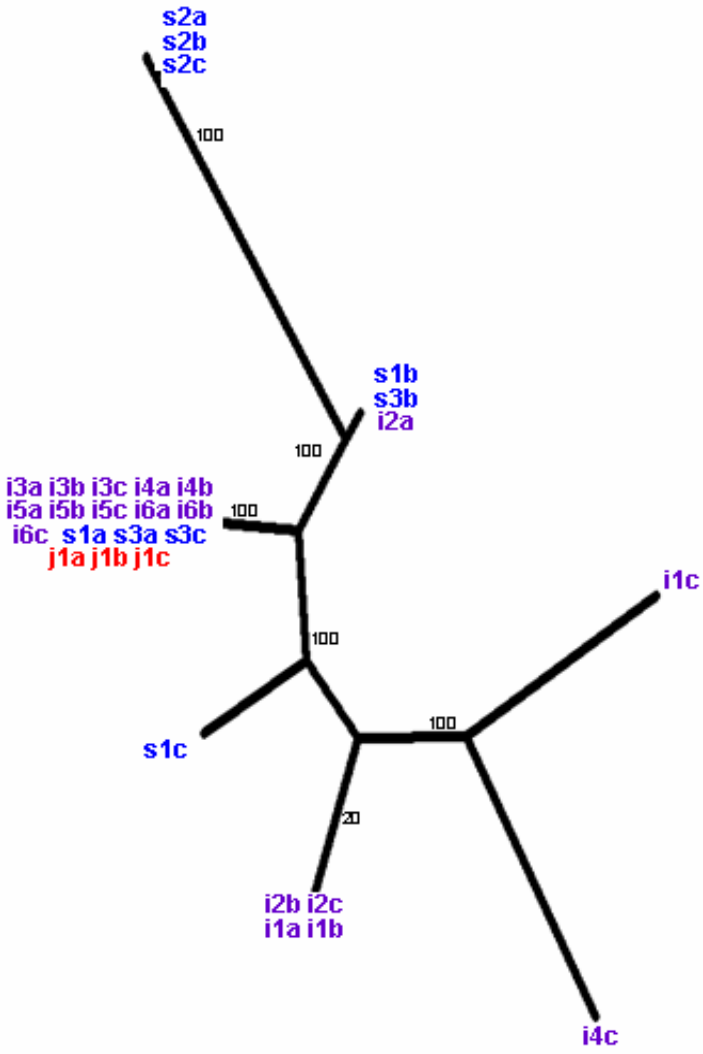


Figura 3.14. Análisis de Coordenadas Principales de 30 individuos pertenecientes a muestras de porotos primitivos procedentes de tres localidades del NOA, analizados mediante marcadores RAPD (Coeficiente de similitud de Jaccard, % de la variabilidad total: 98,36%)



En la figura 3.15 se observa el árbol de Neighbor Joining realizado a partir de la matriz de similitud de Jaccard. Igual que en los resultados de las técnicas anteriores se ve la separación de la muestra s2, de Santa Victoria, del resto de las muestras, la mayoría de las cuales forman parte de un mismo grupo ubicado hacia la izquierda. Los individuos i2a, s1b y s3b formaron otro grupo relacionado con la muestra s2 pero a gran distancia. Los individuos i4c e i1c se agrupan a gran distancia entre sí y con los restantes, al igual que s1c. El grupo formado por los individuos i2b, i2c, i1a e i1b tiene un bajo valor de soporte de bootstrap.

Figura 3.15. Árbol de Neighbor Joining de porotos primitivos usando marcadores RAPD. J, S y T: muestras; a-c: individuos.



Aplicando el test estadístico de Mantel (1967) no se observó una correlación significativa entre las distancias geográficas existentes entre los sitios de recolección de las muestras poblacionales y las matrices de similitud de Simple Matching (r =0,053, p= 0,292) y Jaccard (r = 0,013; p= 0,551) obtenidas a partir de los marcadores RAPD. Por otro lado, la correlación entre las diferencias de altura entre los sitios y las matrices de similitud fue significativa pero de muy baja magnitud (SM: r =0,085; p< 0,05 y J: r =0,129; p< 0,05).

Marcadores ISSR

Bandas polimórficas

Se trabajó con un total de 10 "primers" que mostraron un patrón de amplificación claro para todos los genotipos. Solo 4 "primers", A, C, D y G amplificaron fragmentos de ADN polimórficos (Tabla 3.F). La Tabla 3.G es un resumen de los resultados de las reacciones de amplificación.

Tabla 3.F. Resultados de la amplificación para cada "primer"

Primer	Secuencia (5'-3')	Temperatura de hibridación(ºC)	Total de bandas amplificadas	Total de bandas polimórficas
A	$(AC)_8$	55	8	2
C	$(AG)_8CG$	48	14	6
D	$(AG)_8$	48	12	1
G	$GAG(CAA)_5$	48	10	3

Tabla 3.G. Productos de amplificación obtenidos de 10 muestras primitivas de *Phaseolus vulgaris* mediante marcadores ISSR.

Número total de "primers"	10
Número de "primers" polimórficos	4
Total de bandas amplificadas por los "primers" polimórficos	44
Total de bandas polimorficas identificadas	12
Tamaño de las bandas amplificadas	350-2000 pb
Promedio de bandas amplificadas por "primer" polimórfico	11
Promedio de bandas polimórficas	3
Porcentaje de bandas polimórficas	27%
Porcentaje de "primers" polimórficos	40%

Se amplificaron un total de 44 fragmentos de ADN, de los cuales 12 fueron polimórficos. El número promedio de bandas generadas por “primer” polimórfico fue de 11 con un máximo de 14 para el “primer” C, siendo el promedio de 3 bandas polimórficas por “primer”. La mayoría de los fragmentos de ADN amplificados con el “primer” A son monomórficos (Figura 3.16). Sin embargo, también se observó variabilidad entre y dentro de las muestras. Las amplificaciones de ADN con el “primer” C (Figura 3.17) también generaron bandas polimórficas. De un total de 14 bandas amplificadas una banda de aproximadamente 1700 pb no se observó en los patrones de amplificación de los individuos de las muestras i1, i5, i6 y s1. Con el “primer” G se observaron 3 bandas polimórficas de un total de 10 bandas amplificadas (Figura 3.18). Una banda de aproximadamente 600 pb sólo se amplificó a partir del ADN de los individuos de la muestra i4, un individuo de la muestra s3 y dos individuos de la muestra i2. Del total de bandas obtenidas con el “primer” D (12 bandas) sólo una fue polimórfica (Figura 3.19).

Figura 3.16. Amplificación de ADN de diez muestras de porotos primitivos utilizando el “primer” A. i, j y s: muestras; a-c: individuos.

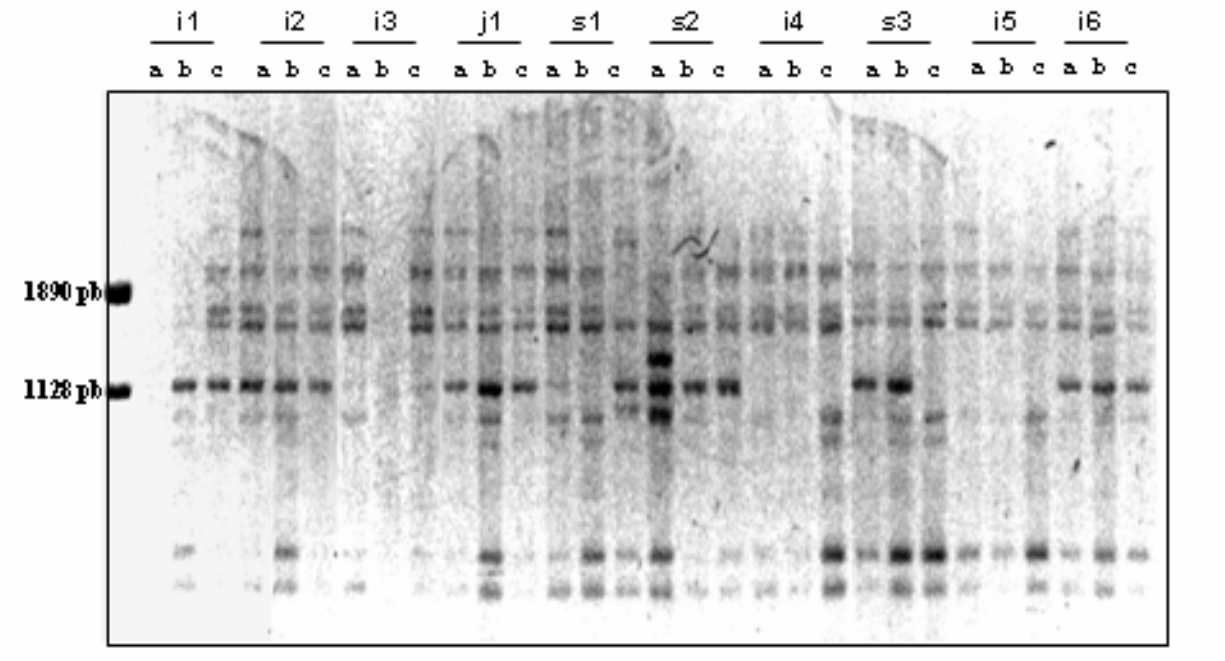


Figura 3.17. Amplificación de ADN de diez muestras de porotos primitivos utilizando el "primer" C. i, j y s: muestras; a-c: individuos.

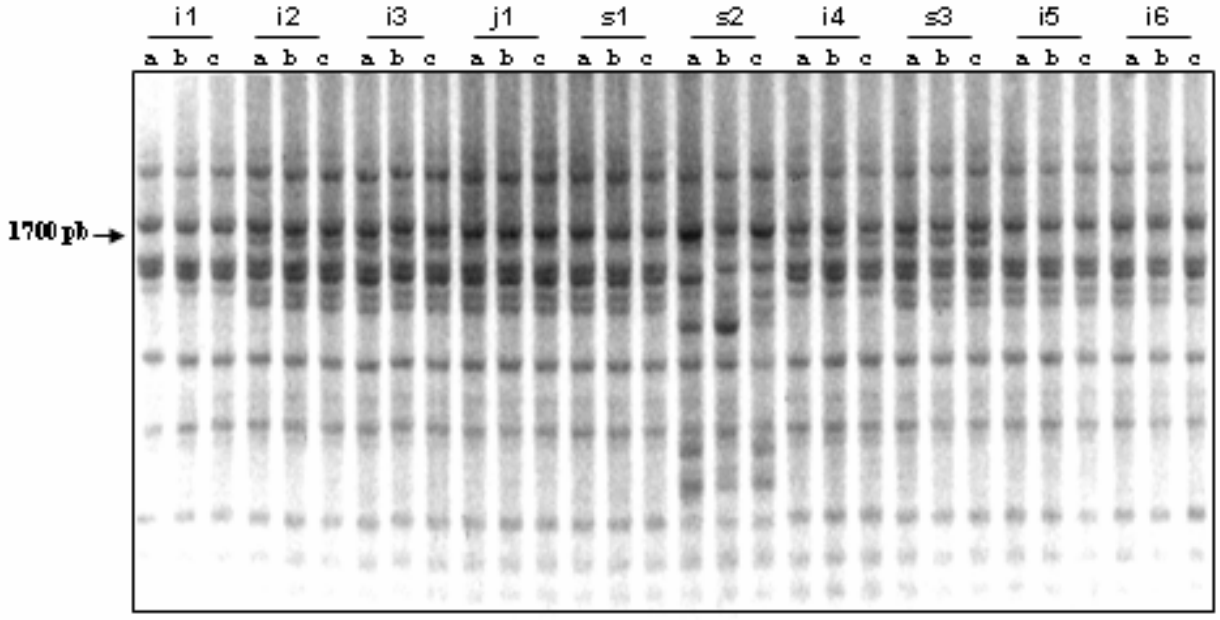


Figura 3.18. Amplificación de ADN de diez muestras de porotos primitivos utilizando el "primer" G. i, j y s: muestras; a-c: individuos.

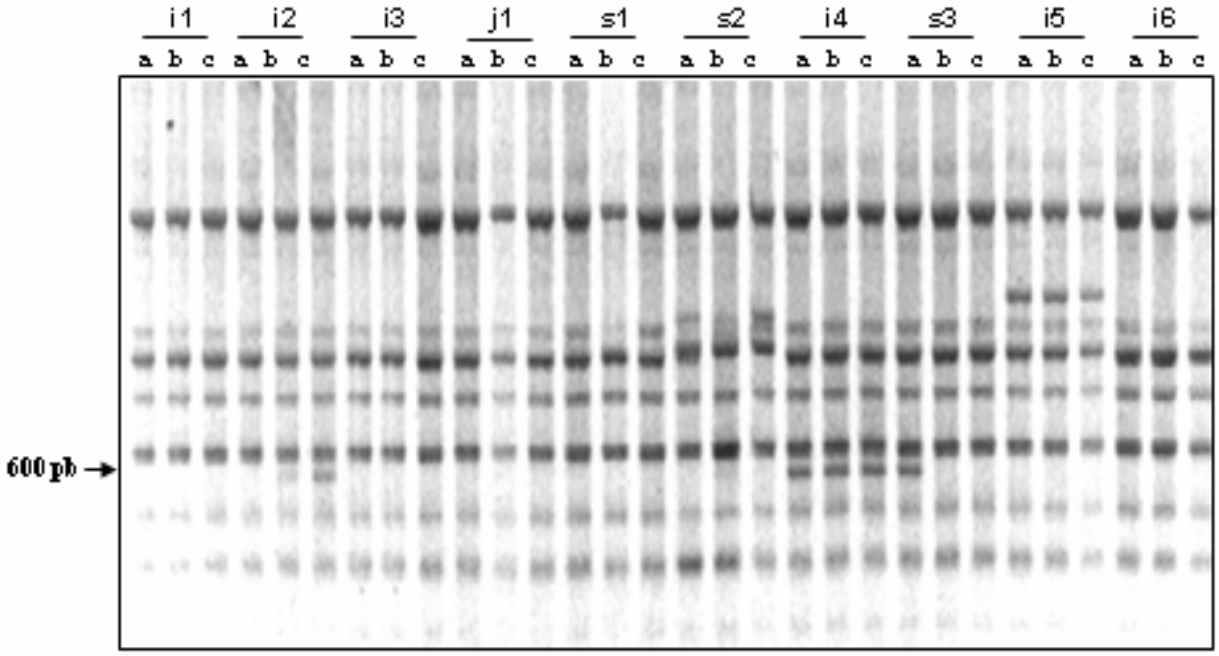
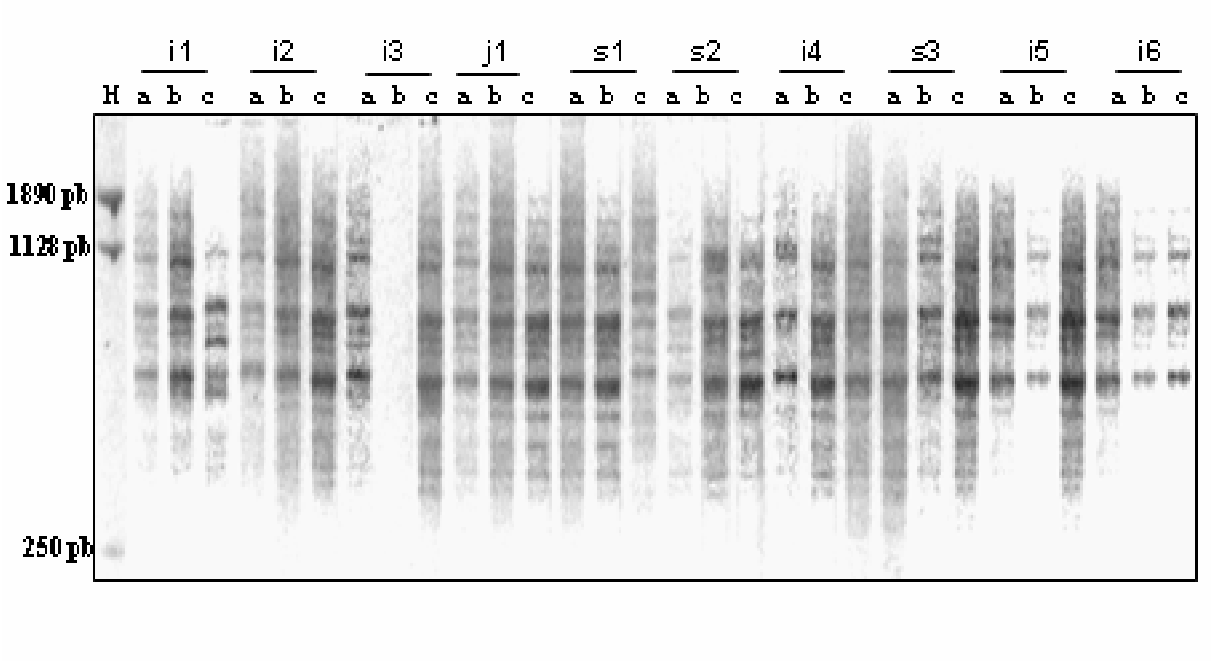


Figura 3.19. Amplificación de ADN de diez muestras de porotos primitivos utilizando el "primer" D. i, j y s: muestras; a-c: individuos.



Análisis de agrupamientos y de Coordenadas Principales.

A partir de la Matriz Básica de Datos que se muestra en la Tabla 3.H se obtuvieron las matrices de similitud aplicando los índices de asociación de Jaccard y de Simple Matching y luego se generaron dos fenogramas (Figuras 3.20 y 3.21). El coeficiente de Simple Matching mostró un rango entre 0,33 y 1 con una media de 0,67. Por otro lado, el coeficiente Jaccard varió entre 0,01 y 1 con una media de 0,82. Los coeficientes de correlación cofenética (CCC) fueron de 0,87 para el fenograma obtenido mediante Simple Matching: 0,87 y de 0,84 para Jaccard.

Tabla 3.H. Matriz Básica de Datos obtenida a partir de las amplificaciones de ADN de 30 individuos pertenecientes a muestras de porotos primitivos de tres localidades del NOA, analizados aplicando la técnica de ISSR. (PR: "primer"; TB: Total de bandas amplificadas; BP: Bandas polimórficas; i, j y s: muestras; a-c: individuos; (-): dato faltante).

				i1			i2			i3			i4			i5		
PR	**TB**	**BP**		a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
A	8	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	1	1	1	1	-	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
C	14	6	2	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
			4	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
			6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	12	1	2	1	1	1	1	-	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
G	10	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
			3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			6	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0

				i6			s1			s2			s3			j1		
PR	**TB**	**BP**		a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
A	8	2	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
			2	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1
C	14	6	2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
			4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			5	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
			6	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
			9	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
			10	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
D	12	1	2	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
G	10	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			3	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
			6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

En ambos fenogramas la mayoría de los individuos (87%) se agruparon por muestras, sin embargo con el coeficiente de Jaccard los valores de similitud registrados fueron mucho más bajos (Figuras 3.21).

En el fenograma obtenido empleando el coeficiente de Simple Matching (Figura 3.20) se observan tres agrupamientos principales. La muestra s2 (de Santa Victoria) se asocia con resto de las muestras a una baja similitud (0,40). En el grupo principal se distinguen dos subgrupos. Uno de ellos está integrado por las muestras i5, i6 y s3, y el otro por las demás muestras. En el fenograma obtenido empleando el coeficiente de Jaccard los agrupamientos son diferentes, aunque se mantienen algunas relaciones (Figura 3.21). Por ejemplo, un cluster agrupa a las muestras i1 de Iruya, s1 de Santa Victoria y j1 de Tilcara. Otro cluster está formado sólo por muestras de Iruya (i2, i3 e i4) y un tercer cluster agrupa a las muestras i6 de Iruya y s3 de Santa Victoria.

En la Tabla 3.I se muestran los eigenvalores correspondientes a las tres primeras coordenadas principales. En el Análisis de Coordenadas Principales los agrupamientos por muestra no son tan claros como en el análisis de cluster. Sin embargo, en el gráfico obtenido mediante Simple Matching se observó una clara separación de la muestra s2 hacia la izquierda del gráfico (Figura 3.22), pero no fue así en el gráfico obtenido con el coeficiente de Jaccard (Figura 3.23).

Tabla 3.I. Eigenvalores de las tres primeras coordenadas principales aplicando los coeficientes de asociación de Simple Matching y Jaccard (CP: Coordenada principal).

CP	Simple Matching			Jaccard		
	Eigenvalor	Porcentaje	Acumulado	Eigenvalor	Porcentaje	Acumulado
1	2.00223388	24.2597	24.2597	4.46454090	21.2085	21.2085
2	1.79194445	21.7118	45.9715	3.86158874	18.3442	39.5527
3	1.60746765	19.4766	65.4481	3.52435489	16.7422	56.2949

Figura 3.20. Fenograma de 30 individuos pertenecientes a muestras de porotos primitivos procedentes de tres localidades del NOA, analizados mediante marcadores ISSR (Coeficiente de similitud de Simple Matching, CCC: 0,87)

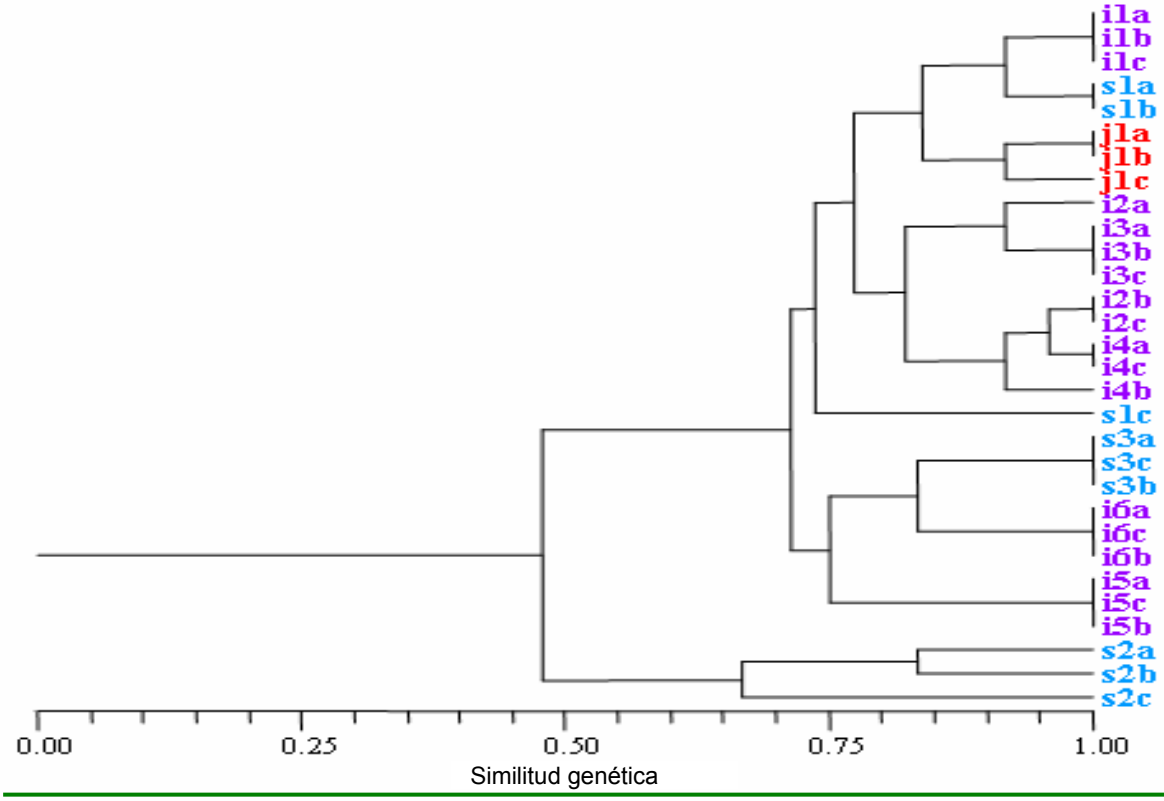


Figura 3.21. Fenograma de 30 individuos pertenecientes a muestras de porotos primitivos procedentes de tres localidades del NOA, analizados mediante marcadores ISSR (Coeficiente de similitud de Jaccard, CCC: 0,84)

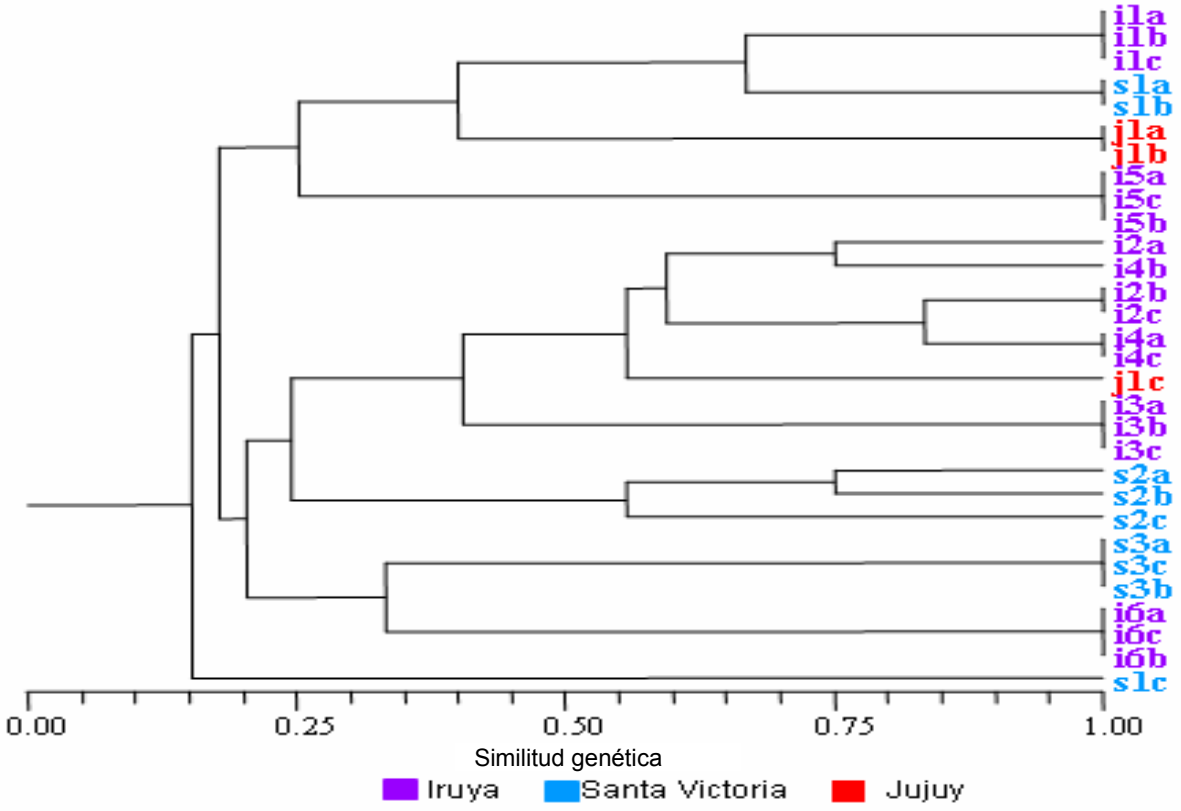


Figura 3.22. Análisis de Coordenadas Principales de 30 individuos pertenecientes a muestras de porotos primitivos provenientes de tres localidades del NOA, analizados mediante marcadores ISSR (Coeficiente de similitud de Simple Matching, % de la variabilidad total: 1er: 21.54% 2da: 18.70% Total: 40.24%)

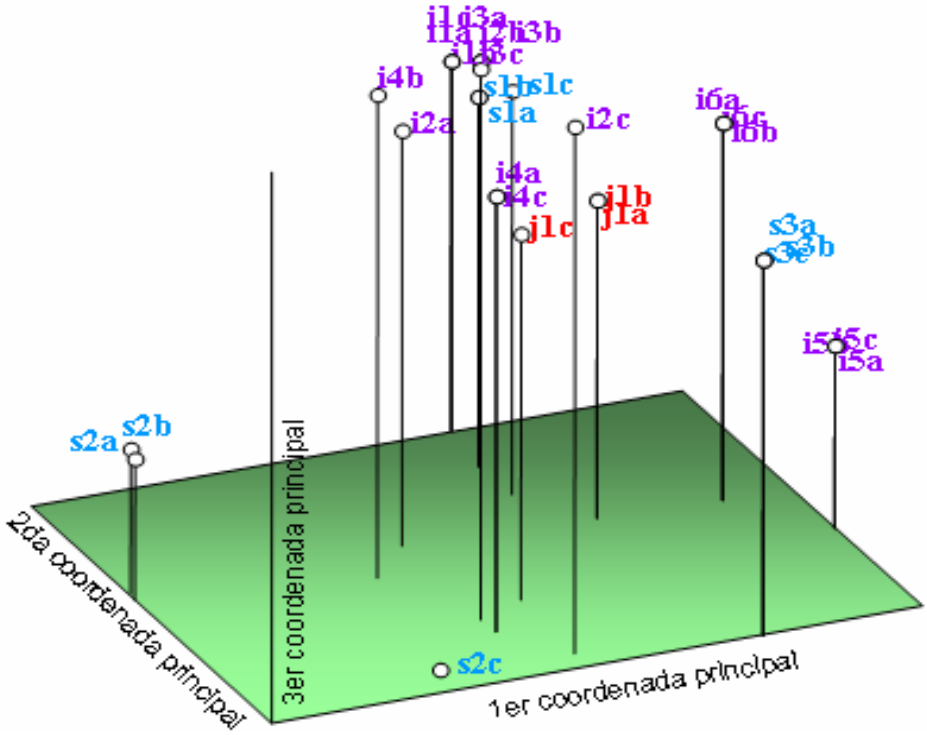
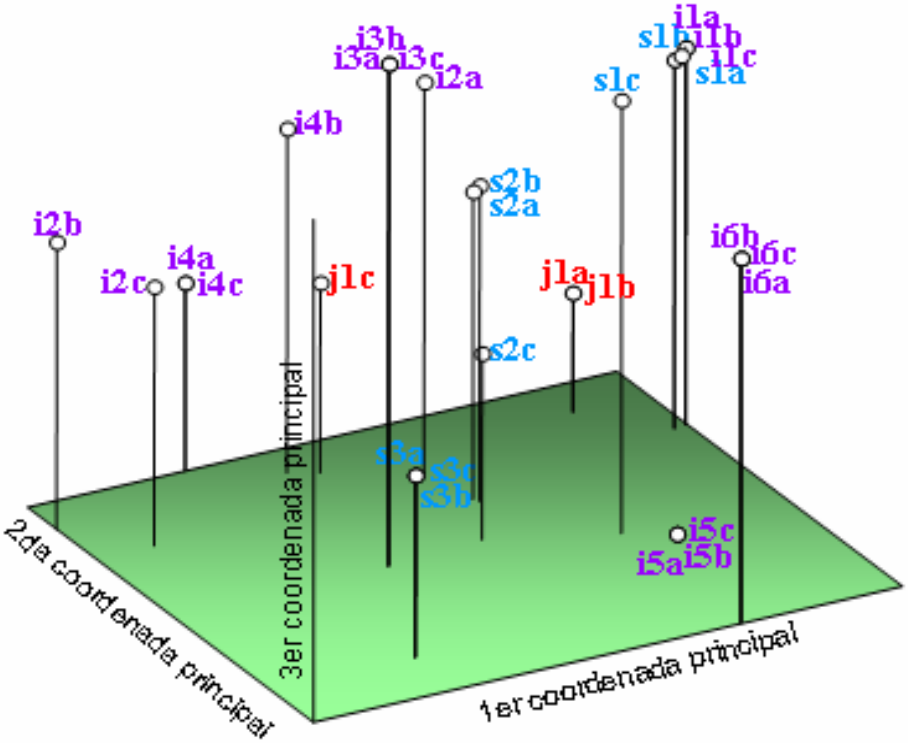


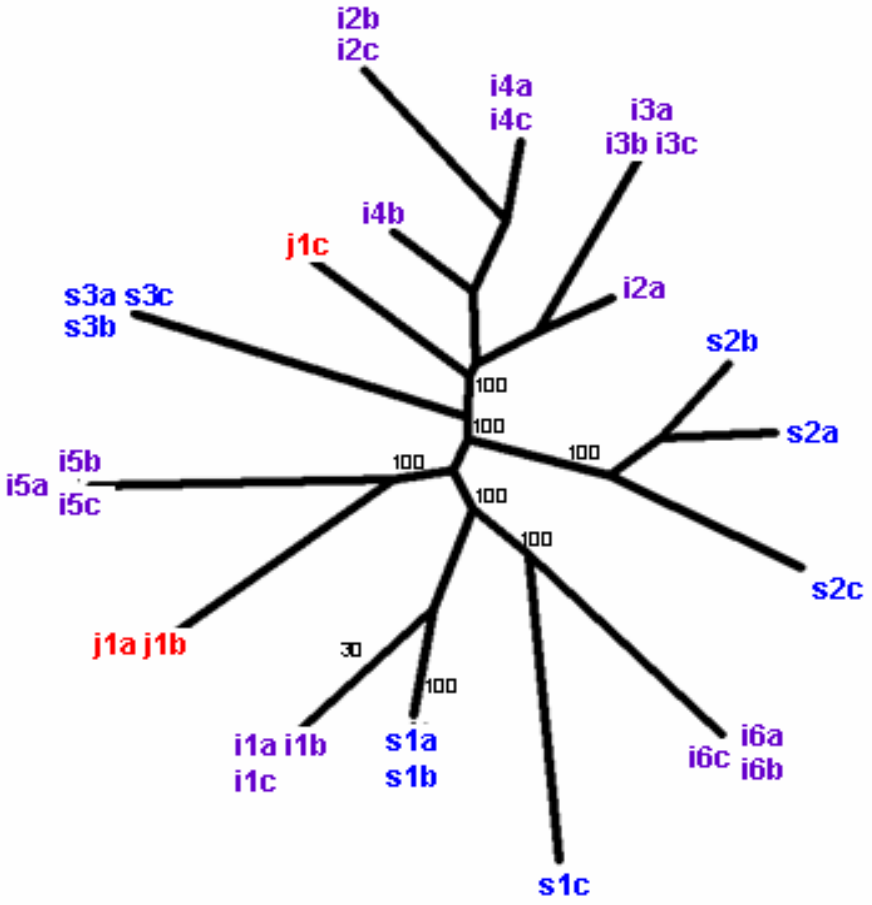
Figura 3.23. Análisis de Coordenadas Principales de 30 individuos pertenecientes a muestras de porotos primitivos provenientes de tres localidades del NOA, analizados mediante marcadores ISSR (Coeficiente de similitud de Jaccard, % de la variabilidad total: 1er: 20.05% 2da: 17.94% Total: 37.99%)



En la Figura 3.24 se muestra el árbol de Neighbor Joining realizado a partir de la matriz de similitud de Jaccard. Se observa gran similitud genética entre la mayoría de los individuos de una misma muestra (87%). Los únicos individuos que aparecen separados de los restantes de la misma muestra son s1c, j1c, i2a e i4b. Asimismo, los individuos de una misma muestra son generalmente idénticos. La única muestra con sus tres individuos perfectamente diferenciados es s2.

Las muestras i2, i3 e i4 de Iruya se asocian en un cluster, junto con el individuo j1c, mientras que la i6 se asemeja a los individuos de la muestra s1 de Santa Victoria. Por otro lado, la muestra i5 se agrupa con la j1 de Tilcara, pero con baja similitud. Las muestras s2 y s3 de Santa Victoria forman clusters separados.

Figura 3.24. Árbol de Neighbor Joining de 30 individuos pertenecientes a muestras de porotos primitivos de tres localidades del NOA, analizados mediante marcadores ISSR. s, j e i: muestras; a-c: individuos.



Aplicando el test estadístico de Mantel (1967) no se observó una correlación significativa entre las distancias geográficas existentes entre los sitios de recolección de las muestras poblacionales y las matrices de similitud de Simple Matching (r =0,072, p= 0,231) y Jaccard (r = 0,167; p= 0,07) obtenidas a partir de los marcadores ISSR. Por otro lado, la correlación entre las diferencias de altura entre los sitios y las matrices de similitud fue significativa pero de muy baja magnitud (SM: r =0,142; p< 0,05 y J: r =0,143; p< 0,05).

Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA).

El total de patrones diferentes (haplotipos) obtenidos con los marcadores RAPD fue de 7 y con los ISSR fue de 16. En la Tabla 3.J se muestran los haplotipos obtenidos por muestra.

Tabla 3.J. Haplotipos obtenidos por muestra empleando marcadores moleculares.

Localidad	Muestra	Haplotipos (RAPD)	Haplotipos (ISSR)
	i1	1, 2	1
Iruya (Salta)	i2	4, 1	2, 3
(5 Hapl. RAPD)	i3	5	4, 9
(9 hapl. ISSR)	i4	4, 5, 7	12, 13
	i5	2, 5	15
	i6	5	16
Santa Victoria	s1	2, 3, 5	7, 8
(5 Hapl. RAPD)	s2	6	9, 10, 11
(6 Hapl. ISSR)	s3	4, 5	14
Jujuy	j1	4, 5	5, 6
(2 Hapl. RAPD)			
(2 Hapl. ISSR)			
TOTAL		7	16

El resultado del análisis de la varianza molecular se muestra en la Tabla 3.K.

El AMOVA mostró una gran variación dentro de los departamentos de Iruya (muestras i1 a i6) y Santa Victoria (muestras s1 a s3), con un 95,03% de la variación total para RAPD y 91,12% para ISSR. La diferenciación entre departamentos fue significativa sólo para los ISSR.

Tabla 3.K. Resultados del análisis molecular de la varianza existente en las muestras de porotos primitivos estudiadas.

	RAPD			ISSR		
Fuente de variación	% de la varianza total	P	Estadístico ϕ	% de la varianza total	P	Estadístico ϕ
Entre localidades	4,97%	0,097	ϕ_{st} =0,0497	8,88%	<0,01	ϕ_{st} =0,0888
Dentro de localidades	95,03%			91,12%		

Análisis de diversidad genética.

Mediante el análisis de proteínas de reserva de las diez muestras primitivas de *Phaseolus vulgaris* L. se detectó un bajo nivel de polimorfismo. Sólo se identificaron dos patrones diferentes de faseolinas (T y J) los cuales son característicos del acervo génico andino (Gepts y Bliss, 1988). La faseolina T se observó con mayor frecuencia (88%) y la J en menor proporción (12%). La escasa variabilidad detectada entre las muestras primitivas con los marcadores bioquímicos, aun cuando estas incluyen una mezcla de materiales segregantes, coincide con resultados previos descriptos por Singh *et al*. (1991b), Santalla *et al*. (2003) y De Ron *et al.* (2004). Según De Ron *et al*. (2004) el nivel de variabilidad observado puede atribuirse al hecho de que los diferentes tipos de faseolina se encuentran fijados y permiten una mayor diferenciación a nivel de razas que entre poblaciones. La selección para la adaptación a nuevos ambientes y la domesticación habrían llevado a la fijación de tipos de faseolina junto a caracteres de interés según la zona de cultivo (Kami *et al*., 1995). Por ejemplo, Johnson *et al*. (1996) determinaron la existencia de ligamiento entre el locus *Phs* que codifica para faseolina y los caracteres peso de semilla y color de semilla.

Las muestras de porotos primitivos también se caracterizaron mediante fingerprints generados con “primers” RAPD e ISSR. Sólo el 15% de los “primers” RAPD probados amplificaron bandas polimórficas. Los “primers” RAPD generaron 7 patrones de amplificación únicos que permitieron diferenciar el 23% de los individuos de las distintas muestras. Con la técnica de ISSR el 40% de los “primers” generaron bandas polimórficas, obteniéndose 16 patrones de bandas únicos que permitieron diferenciar el 53% de los individuos.

El bajo nivel de polimorfismo registrado empleando los marcadores RAPD coincide con lo observado anteriormente en poblaciones primitivas de porotos Andinos (Beebe *et al.*, 2001). En principio, la baja variabilidad podría atribuirse al hecho de que la mayoría de las muestras analizadas provienen de una misma área fitogeográfica (Provincia de las Yungas) y un reducido rango altitudinal (2400 a 2900 msnm), lo que determinaría características de adaptación similares y muy definidas entre las muestras. Sin embargo, los marcadores ISSR revelaron una mayor variabilidad genética al igual que el análisis de datos morfológicos. Los diferentes caracteres morfológicos de semilla, hoja y vaina, evaluando nueve muestras de diez individuos de porotos primitivos, sugieren la existencia de una gran variabilidad (Tabla 3.L; Figura 3.25). En el fenograma obtenido con los datos morfológicos aportados por la Dra. Menéndez Sevillano, se observan dos grupos principales, en uno las muestras de Iruya se agrupan con las de Tilcara (i1, i3 y j1) y en el otro las restantes muestras de Iruya se agrupan con las de Santa Victoria (s1, s2, i4, i5, s3, i6). Este fenograma no refleja las mismas relaciones entre muestras que los resultados obtenidos con los datos moleculares excepto por la mayor similitud entre las muestras i6 y s3, cuya relación también se observó en los fenogramas basados en los marcadores ISSR (Figuras 3.20 y 3.21). El Análisis de Componentes Principales (Ver Anexo 5, pág.182) permitió determinar que los caracteres grosor de la semilla, largo de la hoja, y ancho de la vaina contribuyen a la diferenciación de las muestras i5, i6 y s3 en el primer Componente Principal.

Gómez *et al.* (2004) sugieren que los caracteres fenotípicos en las poblaciones primitivas estarían sujetos tanto a selección natural como artificial, ya que las condiciones ambientales y los criterios de selección de los agricultores llevarían a una divergencia entre las poblaciones. La gran variabilidad morfológica también fue reportada por De Ron *et al.*, (2004) que empleando caracteres

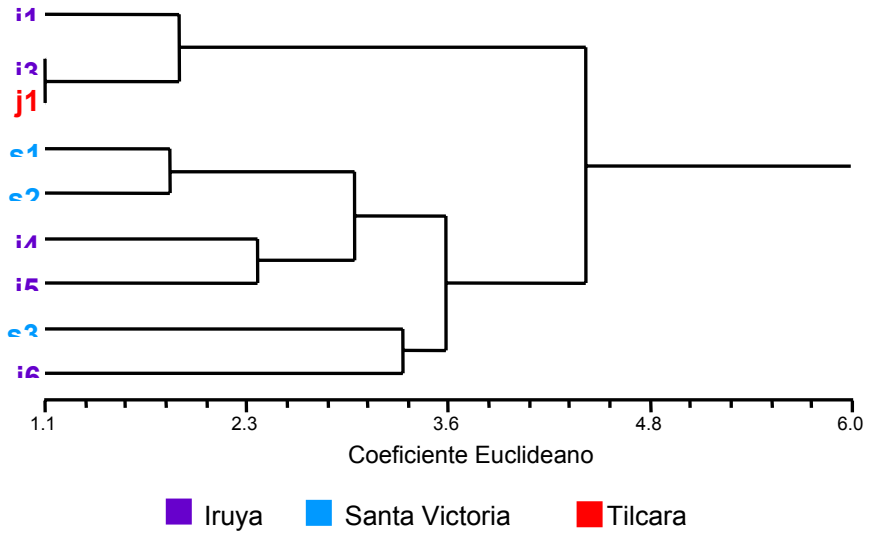
morfológicos analizaron más de 40 variedades de porotos primitivos de Salta y Jujuy observando una dispersión de la diversidad a lo largo y ancho del NOA con patrones de variación que se repiten en las diferentes zonas. En esta zona del NOA la geografía consiste en valles separados por montañas de 2500 a 6000 msnm lo que estaría limitando la comunicación entre los sitios. Por lo tanto, es posible que el proceso de selección y adaptación posterior a la domesticación haya ocurrido en forma simultánea e independiente en los diferentes lugares, conduciendo esto a la variabilidad morfológica observada.

Tabla 3.L. Caracteres morfológicos de nueve muestras primitivas del Noroeste Argentino. Cada valor representa el promedio de diez plantas (Menéndez Sevillano, 2002).

Código de entrada		Semilla			Peso de 100 semillas (g)	Hoja		Vaina		
		largo (mm)	ancho (mm)	grosor (mm)		largo (mm)	ancho (mm)	longitud (mm)	ancho (mm)	grosor (mm)
i1	VAV3716-G	13.30	8.30	5.90	46.92	7.41	5.13	11.44	15.10	9.80
i2*	VAV3716-T	12.30	7.30	5.60	n.d.	n.d	n.d	n.d.	n.d.	n.d.
i3	VAV3716-U	14.00	8.10	5.70	44.67	7.40	4.45	10.47	10.50	9.00
i4	MCM69-A	12.00	7.38	5.83	37.00	12.92	8.85	13.49	9.76	5.65
i5	MCM109	10.50	6.54	5.05	42.00	11.62	8.73	12.31	9.48	6.17
i6	MCM110	10.78	8.41	6.76	46.00	12.37	7.76	9.57	10.8	7.23
j1	VAV5674-D	13.30	8.00	5.80	43.56	8.02	4.91	11.78	11.10	8.00
s1	VAV5867	12.80	7.40	6.07	48.00	10.52	7.96	12.24	8.94	6.00
s2	MCM18	14.50	8.07	6.20	44.00	11.36	9.67	13.21	9.24	6.90
s3	MCM79-A	12.19	6.97	5.91	48.00	12.85	8.87	7.43	7.00	4.20

*la muestra i2 no se incluyó en el análisis por presentar gran cantidad de datos faltantes. n.d.: no determinado

Figura 3.25. Fenograma de nueve muestras de porotos primitivos empleando caracteres morfológicos.



La falta de correspondencia en las relaciones entre muestras, reflejadas por los datos morfológicos y moleculares, podría atribuirse al hecho de que estos últimos

no presentan influencia ambiental. En el caso de los marcadores ISSR permiten identificar perfectamente cada una de las muestras estudiadas, reconocibles sobre la base de caracteres morfológicos de las semillas, principalmente tamaño y color del tegumento, por lo que estarían reflejando más claramente el proceso de selección artificial llevado a cabo por los agricultores.

Utilizando los marcadores ISSR el 87% de los individuos se agruparon por muestra. La asociación entre haplotipos moleculares generados con marcadores ISSR y el color del tegumento de las semillas de porotos primitivos también fue reportado por González *et al.* (2005), quienes analizando cuatro variedades primitivas de México mediante la técnica de ISSR agruparon al 92% de los individuos de acuerdo con el color del tegumento de la semilla. Los marcadores ISSR se encuentran distribuidos a lo largo de todo el genoma del poroto común al igual que los genes que codifican para el color y los patrones del tegumento de la semilla (McClean *et al.*, 2002), por lo tanto cierto grado de ligamiento entre ambos es esperable en ausencia de entrecruzamientos y de recombinación, sobre todo porque un sistema de reproducción predominantemente autógamo favorece la existencia de asociaciones multilocus más allá de que los loci involucrados se encuentren ligados o no (González *et al.*, 2005).

Análisis de agrupamientos y de coordenadas principales.

Los fenogramas obtenidos a partir del análisis de clusters realizado con los datos moleculares mostraron un agrupamiento de la mayoría de los individuos con valores de similitud elevados, mayores a 0,88 y 0,70 para los marcadores RAPD e ISSR, respectivamente. Sin embargo, empleando el coeficiente de Jaccard, que no considera la ausencia de bandas a favor de la similitud, se observaron valores de similitud mucho menores, lo que indicaría que con el coeficiente de Simple Matching se estaría sobrestimando la similitud genética entre los individuos, principalmente

porque al tratarse de marcadores dominantes la falta de amplificación de una banda puede deberse a múltiples causas (inversiones, deleciones, traslocaciones, mutaciones puntuales, etc.).

El agrupamiento de los individuos por muestra de origen fue claro en la mayoría de los casos empleando los marcadores ISSR (Figuras 3.20, 3.21 y 3.24) y prácticamente nulo en el caso de los RAPD.

El Análisis de Coordenadas Principales no mostró una ordenación de los individuos por muestras tan clara como el agrupamiento de clusters, sin embargo se observó la separación de la muestra s2 de Santa Victoria del resto de las muestras como ocurre en los fenogramas.

La variabilidad observada en la muestra s2 de Santa Victoria comparada con el resto de las muestras, podría deberse a la existencia de cierto grado de hibridación con poblaciones silvestres de la región. Complejos formados como resultado de la hibridación entre porotos silvestres y domesticados han sido descriptos por De Ron *et al.* (2004), quienes observaron en muchas zonas del NOA que las poblaciones silvestres se encuentran cerca de los porotos domesticados. Mas aún, los agricultores suelen multiplicar las semillas con características intermedias y de esta manera se mantiene una variedad heterogénea proporcionando al cultivo mayor plasticidad de respuesta a potenciales condiciones adversas (Menéndez Sevillano, 2002).

Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA).

El número de haplotipos identificados con RAPD fue mucho menor que los identificados con ISSR (7 y 16 haplotipos respectivamente). Los marcadores ISSR mostraron mayor eficiencia en la detección de polimorfismos en relación a los RAPD. El porcentaje de bandas polimórficas fue mayor con la técnica de ISSR (27%) que con los RAPD (14%). Esto coincide con lo observado en los análisis anteriores

donde los marcadores ISSR demostraron ser muy eficientes en la detección de variabilidad entre los porotos primitivos, agrupando a gran parte de los individuos por muestra, mientras que los RAPD no permitieron identificar claramente a los individuos ni a las muestras. Estos resultados también se corresponden con trabajos anteriores que demostraron la eficiencia de los ISSR en la identificación de diferentes poblaciones de porotos domesticados (Galván *et al*., 2003; González *et al.*, 2005) y con lo observado en poblaciones silvestres de la zona (Ver Capítulo 2).

La baja variabilidad intramuestra reflejada por el número de haplotipos (Tabla 3.J) es esperable tratándose de porotos domesticados y debido a que el tamaño de las muestras es pequeño, sin embargo la variabilidad genética observada dentro de cada una de las localidades o sitios muestreados es muy elevada. En la subdivisión de la varianza se observó que más del 90% de la variabilidad resultó de diferencias a nivel de ADN entre individuos de muestras dentro de las localidades (Iruya y Santa Victoria) y solamente entre el 5 y 9% se debe a diferencias entre localidades. Esto sumado a los resultados de la correlación entre matrices estaría indicando la existencia de una menor estructuración geográfica de la variabilidad genética comparada con las muestras silvestres con una baja diferenciación entre poblaciones de distintas localidades. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores en poblaciones de porotos primitivos mesoamericanos de México (Papa y Gepts, 2003; Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2005), y estarían reflejando el intercambio de semillas en los mercados locales y una selección homogénea ejercida por los productores en los distintos ambientes.

Finalmente, cabe destacar que sería interesante complementar los análisis realizados con estudios moleculares de mayor número de muestras, separadas por mayores distancias, ya que el porcentaje de la variabilidad entre localidades se vio levemente incrementado al incorporar la muestra de Tilcara.

CONCLUSIONES

✓ El patrón de distribución de la variabilidad genética de las muestras poblacionales de porotos primitivos de *Phaseolus vulgaris* estudiadas no se asocia con la distribución geográfica de las mismas. Las muestras procedentes de Iruya no forman un grupo separado de aquellas de Santa Victoria, lo que revela una falta de estructuración geográfica de la variabilidad genética, comparada con las poblaciones silvestres.

✓ Se observó una gran variabilidad genética dentro de las localidades o sitios muestreados (más de un 90% de la variabilidad total), con una baja diferenciación entre localidades, lo que podría deberse a una selección homogénea ejercida por los productores en los distintos ambientes y al intercambio de semillas entre los agricultores del área.

✓ En los análisis de agrupamientos y de Coordenadas Principales se diferenció una muestra de Santa Victoria (Salta) cuya elevada variabilidad sugiere que podría resultar de la hibridación con poblaciones silvestres del mismo sitio o de áreas próximas.

✓ La variabilidad genética detectada en las muestras primitivas mediante las fasolinas y los marcadores RAPD fue baja. Los patrones de faseolinas obtenidos se correspondieron con los patrones descriptos para el acervo génico Andino.

✓ Los marcadores ISSR revelaron la existencia de gran variabilidad genética entre las muestras y demostraron ser muy eficientes en la caracterización de los individuos por muestra, las cuales se reconocen principalmente por características morfológicas de las semillas (tamaño y color del tegumento).

✓ Las relaciones de similitud entre las muestras detectadas en base a los marcadores moleculares no es congruente con la observada empleando datos morfológicos.

CAPÍTULO 4

Análisis de la variabilidad genética de poblaciones silvestres y primitivas de *Phaseolus vulgaris*

Las poblaciones de porotos silvestres y primitivos de la Argentina presentan una serie de características morfológicas diferenciales, algunas de ellas probablemente adaptativas. El peso de las vainas inmaduras y las semillas de los porotos primitivos es mayor, lo que se asocia con una estructura vegetativa más robusta que la de los porotos silvestres. Los porotos domesticados muestran gigantismo en la semilla, acompañado por una menor ramificación, un menor número de hojas y tallos robustos que sostienen hojas de mayor peso y tamaño. Estas poblaciones con hojas más grandes tendrían ventajas en hábitats con luz difusa, como las selvas subtropicales, donde el estrato arbóreo permite el pasaje de menor radiación a los estratos inferiores.

La gran mayoría de los porotos silvestres y primitivos del NOA presenta un hábito de crecimiento indeterminado trepador (tipo IV) mientras que los cultivares comerciales mejorados poseen hábito determinado arbustivo (tipo I) o indeterminado arbustivo o trepador (tipos II y IV) (Figura 1.3, pág.12). Esto probablemente refleja las prácticas de los agricultores nativos de los Andes, que cultivan los porotos junto con el maíz, utilizándolo como soporte natural, favoreciendo así el hábito de crecimiento trepador de los porotos primitivos.

Stenglein *et al*. (2005) analizaron la variación fenotípica en 11 poblaciones silvestres de *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* del Noroeste Argentino, en lo que respecta a la disposición de los estomas en las hojas, característica que podría contribuir a la resistencia pasiva a patógenos de las poblaciones silvestres. Asimismo, Stenglein y Balatti (2006) demostraron la resistencia a *Phaeoisariopsis griseola* (Deuteromicotina, Moniliales, Stilbaceae) agente de la mancha angular del poroto, en una muestra poblacional de porotos silvestres del NOA. La muestra VAV- 6370

mostró resistencia a 11 de los 13 patotipos de *Phaeoisariopsis griseola* aislados de diferentes zonas de cultivo del NOA, incluyendo resistencia a la raza 63.15 que es la más frecuente en la región. Esto demuestra que probablemente los porotos silvestres contengan genes que podrían ser utilizados en el mejoramiento de los cultivares.

En las poblaciones primitivas también se observa una marcada variación fenotípica. La domesticación y posterior evolución del poroto generó poblaciones primitivas con diversos patrones de manchas de las semillas y con flores blancas y distintos tonos de lila, predominando el blanco como color primario del tegumento de las semillas (color de base) y también de la flor. Smartt (1988) señaló que la producción de pigmentos en la flor es característica de los porotos silvestres, siendo ésta reducida en los porotos domesticados. El patrón moteado de las semillas de los porotos silvestres es una característica ancestral, que representa una ventaja adaptativa, porque de esta manera las semillas quedan enmascaradas en la cubierta vegetal del suelo, siendo prácticamente invisibles. Sin embargo, el cultivo y la selección de estos materiales con fines alimenticios y estéticos condujo a la pérdida de este carácter estableciéndose un mayor rango de colores en las semillas y persistiendo el patrón moteado sólo en los porotos primitivos de tipo cranberry.

Los estudios de ADN del poroto común, como complemento del análisis fenotípico, son de gran importancia y pueden aportar información de particular relevancia para la mejora del cultivo. La mayoría de las investigaciones realizadas hasta el presente en poblaciones de porotos silvestres y primitivos de América permitieron identificar grandes subdivisiones del germoplasma, como pooles génicos y razas (Singh *et al*., 1991a; Gepts *et al*., 1986). De este modo se llegó a establecer que existen dos acervos génicos principales de porotos silvestres y cultivados (Koenig y Gepts, 1989) y que la zona del este de Bolivia y/o el noroeste de la Argentina

probablemente constituyen el centro primario de domesticación del acervo génico Andino. Sin embargo, son pocos los estudios sobre la variabilidad genética de las poblaciones a escala geográfica reducida (Cattan-Toupance *et al*., 1998; Papa y Gepts, 2003). Estos estudios pueden aportar información sobre los factores evolutivos, como la deriva génica, que posiblemente afectan la diversidad de las poblaciones de poroto común, como también la variabilidad y las relaciones de similitud genética entre las poblaciones silvestres y primitivas. Dicha información es de especial utilidad para identificar mecanismos naturales de generación de variabilidad a ser tomados en cuenta en los programas de mejoramiento. Por ejemplo, Cattan-Toupance *et al.* (1998) demostraron la importancia de la presión de selección que ejerce una enfermedad en la diferenciación de poblaciones locales junto con la deriva génica. Además, consideraron a la fecundación cruzada parcial como un factor que puede afectar potencialmente la asociación de ciertos caracteres. Papa y Gepts (2003) establecieron que, en simpatría, el flujo génico de los porotos domesticados hacia los silvestres mesoamericanos es tres veces mas importante que en la dirección opuesta. Asimismo, estudios de autocorrelación espacial mostraron que los porotos silvestres presentan una estructura poblacional mucho más definida que los porotos domesticados.

De la información precedente surge que el manejo eficiente de los recursos genéticos de poroto común, tanto de las poblaciones silvestres como primitivas, en lo que hace a su conservación y aprovechamiento en programas de mejoramiento, requiere de una adecuada y eficiente evaluación de la diversidad y relaciones genéticas entre sus poblaciones. Dichos estudios sirven como punto de partida para el análisis de la dirección del flujo génico entre poblaciones simpátricas y permiten identificar porotos primitivos que podrían utilizarse como intermediarios en los

programas de mejoramiento para la transferencia de genes desde los porotos silvestres a los cultivares comerciales, que presentan mayores niveles de domesticación.

El objetivo del presente capítulo es evaluar la similitud genética entre muestras poblacionales de porotos silvestres y primitivos del Noroeste Argentino, recolectadas en diferentes sitios de las provincias fitogeográficas de las Yungas, Prepuna y Chaqueña, a diferentes alturas. Se emplearon para ello marcadores ISSR, que son los que en análisis previos (capítulos 2 y 3) evidenciaron un mayor nivel de polimorfismo en ambos tipos de muestras. Los resultados se analizaron mediante tres técnicas, UPGMA, Análisis de Coordenadas Principales y Neighbor Joining.

Las preguntas a responder en este capítulo son las siguientes:

- ¿Las poblaciones de porotos silvestres y primitivos forman dos grupos separados?
- ¿Es posible reconocer grupos intermedios entre poblaciones silvestres y primitivas, que sugieran la existencia de complejos “wild-weedy-cultivated”?
- ¿La estructuración geográfica de las poblaciones silvestres se mantiene al analizar éstas conjuntamente con las poblaciones primitivas?
- ¿Los resultados de los análisis realizados permiten inferir que hay fecundación cruzada entre poblaciones silvestres y primitivas?
- ¿Estos resultados son congruentes con aquéllos obtenidos mediante el estudio de caracteres morfoagronómicos?

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se trabajó con las muestras poblacionales de porotos silvestres y primitivos analizadas en los capítulos 2 y 3, provenientes de la colección del Laboratorio de Recursos Fitogenéticos "N. I. Vavilov" de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. Las muestras estudiadas incluyeron materiales recolectados en siete sitios de las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy (Figura 4.1) ubicados entre los 22° y 28° de latitud Sur, y los 64° y 66° de longitud Oeste, a una altitud que osciló entre los 1300 y 2900 msnm. Las características de dichas muestras se observan en la Tabla 4.A. Se empleó letra mayúscula para identificar las muestras de porotos silvestres (S, J y T) y minúscula para las muestras de porotos primitivos (s, i y j).

Análisis de marcadores moleculares

Se procedió al análisis conjunto de los datos obtenidos a partir de los fingerprints generados empleando la técnica de ISSR para el análisis de la variabilidad de las muestras de porotos silvestres y primitivos, siguiendo los pasos explicados en los capítulos 2 y 3. Para el análisis conjunto de los datos se generó una matriz binaria de datos considerando presencia (1) o ausencia (0) de bandas para cada "primer" ISSR. La similitud entre los genotipos se cuantificó aplicando el coeficiente de asociación de Jaccard. A partir de dicha matriz se aplicaron las técnicas de UPGMA, Neighbor Joining (NJ) y Análisis de Coordenadas Principales. La correlación entre la matríz de similitud, las alturas y las distancias geográficas entre los sitios de recolección de las muestras poblacionales se determinó aplicando el test estadístico de Mantel (Mantel, 1967).

El análisis de la varianza molecular (AMOVA) se realizó entre las muestras de porotos silvestres y primitivos. Por otra parte se analizó la varianza entre y dentro de grupos de muestras, agrupando los individuos teniendo en cuenta la latitud y altitud de los diferentes sitios de recolección: 15 individuos de Santa Victoria (2300-2600 msnm), 18 individuos de Iruya (2900 msnm), 12 individuos de Jujuy (1500-2400 msnm) y 12 individuos de Tucumán (1300-1600 msnm).

Figura 4.1. Sitios de recolección de las muestras de porotos silvestres y primitivos estudiados.

Tabla 4.A. Sitios de recolección de las muestras poblacionales de porotos silvestres y primitivos estudiados.

Nomenclatura	Código de entrada	Provincia	Dpto./Localidad	Prov. Fitog.*	Distrito Fitog.	Altitud msnm	Latitud S	Longitud O
SILVESTRES								
S1	VAV-6364	Salta	Santa Victoria	Y	Pastizal de neblina	2300	22° 15’	64° 58’
S2	VAV-6365	Salta	Santa Victoria	Y	Pastizal de neblina	2600	22° 15’	64° 58’
J1	VAV-6362	Jujuy	Tumbaya	P	Prepuna	1900	23° 50’	65° 28’
J2	VAV-6363	Jujuy	Tiraxi	Y	Selva Montana	1600	24° 02’	65° 23’
J3	VAV-6366	Jujuy	S.S. de Jujuy	Ch	Chaco Serrano	1500	24° 11’	65° 18’
T1	VAV-6368	Tucumán	Trancas	Ch	Chaco semiárido	1300	26° 13’	65° 27’
T2	VAV-6369	Tucumán	Trancas (Dpto.)	Ch	Chaco semiárido	1500	26° 13’	65° 27’
T3	VAV-6370	Tucumán	Trancas (Dpto.)	Ch	Chaco semiárido	1500	26° 13’	65° 27’
T4	MCM-146	Tucumán	Chicligasta (Dpto.)	Y	Selva Montana	1600	27° 18’	65° 55’
PRIMITIVOS								
s1	VAV-5867	Salta	Santa Victoria	Y	Pastizal de Neblina	2500	22°15’	64° 58’
s2	MCM-18	Salta	Santa Victoria	Y	Pastizal de Neblina	2400	22°15’	64°58’
s3	MCM-79-A	Salta	Santa Victoria	Y	Pastizal de Neblina	2400	22°15’	64°58’
i1	VAV-3716-G	Salta	Iruya	Y	Pastizal de Neblina	2900	22°50’	65°14’
i2	VAV-3716-T	Salta	Iruya	Y	Pastizal de Neblina	2900	22°50’	65°14’
i3	VAV-3716-U	Salta	Iruya	Y	Pastizal de Neblina	2900	22°50’	65°14’
i4	MCM-69-A	Salta	Iruya	Y	Pastizal de Neblina	2900	22°50’	65°14’
i5	MCM-109	Salta	Iruya	Y	Pastizal de Neblina	2900	22°50’	65°14’
i6	MCM-110	Salta	Iruya	Y	Pastizal de Neblina	2900	22°50’	65°14’
j1	VAV-5674-D	Jujuy	Tilcara	P	Prepula	2400	23°34’	65°22’

* Provincias Fitogeográficas: Ch: Provincia Chaqueña; P, Provincia de la Prepuna; Y, Provincia de las Yungas.

Bandas polimórficas

Los "primers" ISSR empleados fueron A, C, D y G (Tabla 4.B). El total de bandas amplificadas fue de 44, de las cuales 24 bandas fueron polimórficas (21%). Las bandas polimórficas amplificadas mostraron variabilidad tanto entre los grupos de muestras silvestres y primitivas como dentro de las mismas.

Tabla 4.B. Secuencia de los "primers" ISSR utilizados para el análisis conjunto de las muestras de porotos primitivos y silvestres.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tº annealing (°C)	Número de bandas polimórficas
A	$(AC)_8$	57	2
C	$(AG)_8CG$	54	12
D	$(AG)_8$	49	3
G	$GAG(CAA)_5$	52	7

Análisis de agrupamientos y Análisis de Coordenadas Principales

Para el análisis de los datos se generó una matriz básica a partir de la cual se obtuvo una matriz de similitud empleando el coeficiente de asociación de Jaccard, sobre la base del cual se construyó un fenograma aplicando la técnica de UPGMA (Figura 4.2). El coeficiente de correlación cofenética que mide el grado de distorsión del fenograma con relación a la matriz de similitud original, fue de 0,766. El coeficiente de Jaccard mostró un rango entre 0,41 y 1 con una media de 0,69.

En el fenograma se observa cuatro grupos principales señalados con números romanos. El grupo I incluye la gran mayoría de las muestras de porotos primitivos, provenientes de Salta (Iruya y Santa Victoria) y de Jujuy (Tilcara). Estas muestras provienen de sitios localizados entre los 2400 y 2900 msnm, y los 22º y 24º de latitud Sur. Unos pocos individuos silvestres se intercalan en este grupo de muestras primitivas, ellos son el S1c (Santa Victoria) que muestra similitud con las

muestras s1, i1 y j1 (Santa Victoria, Iruya y Tilcara) y los individuos J3b, T1a y T1b (San Salvador de Jujuy y Dpto. de Trancas), que se agrupan con las muestras i2, i3 e i4 de Iruya.

El grupo II está formado exclusivamente por poblaciones silvestres e incluye dos subgrupos, uno integrado por la mayoría de los individuos de Jujuy (Tiraxi, Tumbaya y San Salvador) y el otro por las de Tucumán (Departamentos de Trancas y Chicligasta). Los individuos J3a y J3c de Jujuy forman parte del grupo de Tucumán pero con menor similitud. Los sitios de muestreo del grupo II están localizados entre los 1300 y 1600 msnm, y los 23º y 28º de latitud Sur.

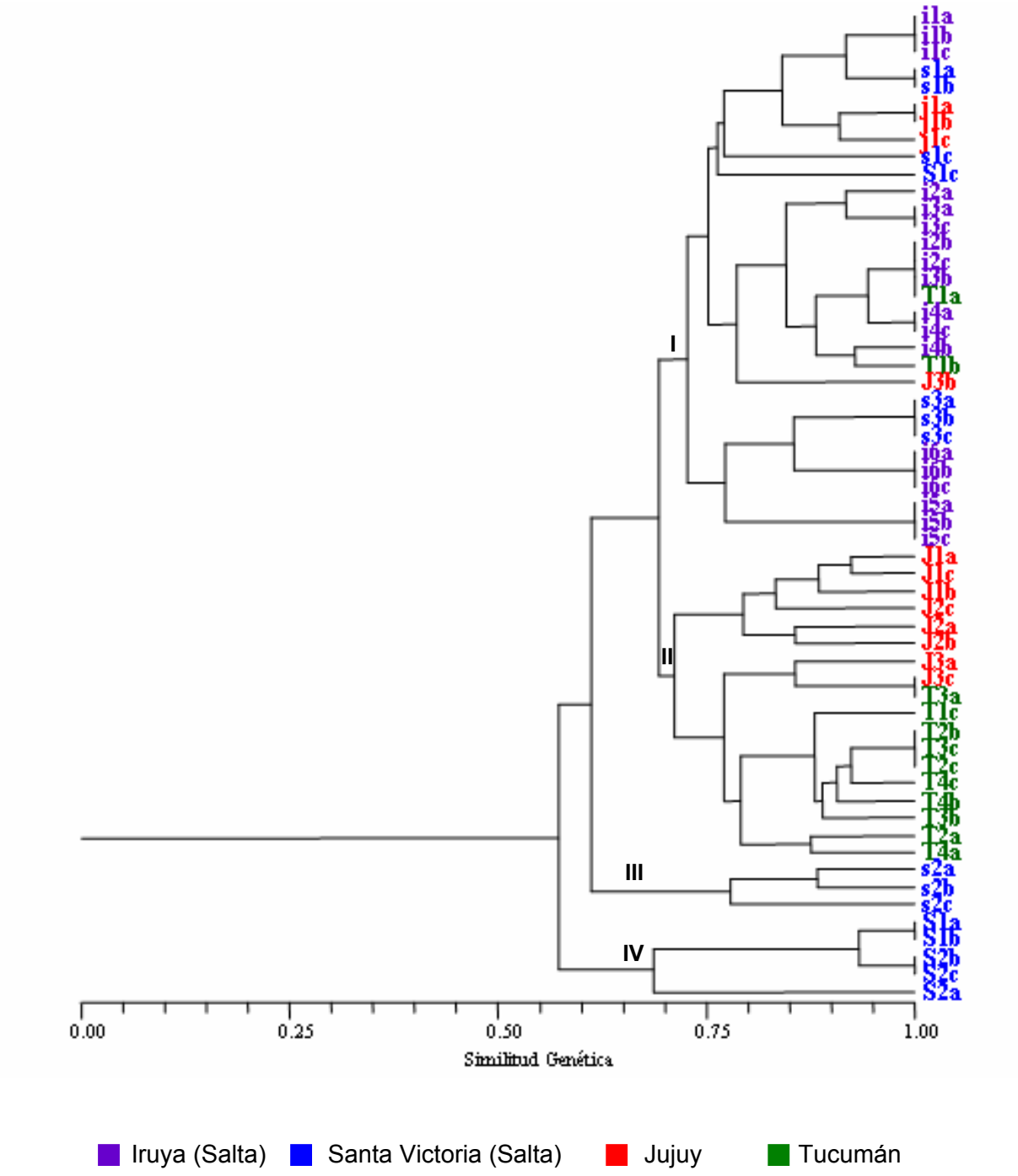
En la parte inferior del fenograma se observan dos grupos (grupos III y IV) que se asocian al agrupamiento mayor (grupos I y II) a bajos niveles de similitud, e incluyen muestras de porotos primitivos y silvestres de Santa Victoria. El grupo III está representado por la muestra s2 (primitiva) y el grupo IV por las muestras S1 y S2 (silvestres), excepto el individuo S1c que mostró mayor similitud con las muestras primitivas del grupo I. Los sitios de donde provienen las muestras de los grupos III y IV están localizados entre los 2300 y 2600 msnm, a 22º 15' de latitud Sur.

Al aplicar el método de ordenación a partir de la matriz de similitud de Jaccard las tres primeras coordenadas calculadas acumularon el 50,16% de la variación de los genotipos. En la Tabla 4.C se brindan los eigenvalores para las cuatro primeras coordenadas principales.

Tabla 4.C. Eigenvalores de las primeras cuatro coordenadas principales aplicando el coeficiente de asociación de Jaccard.

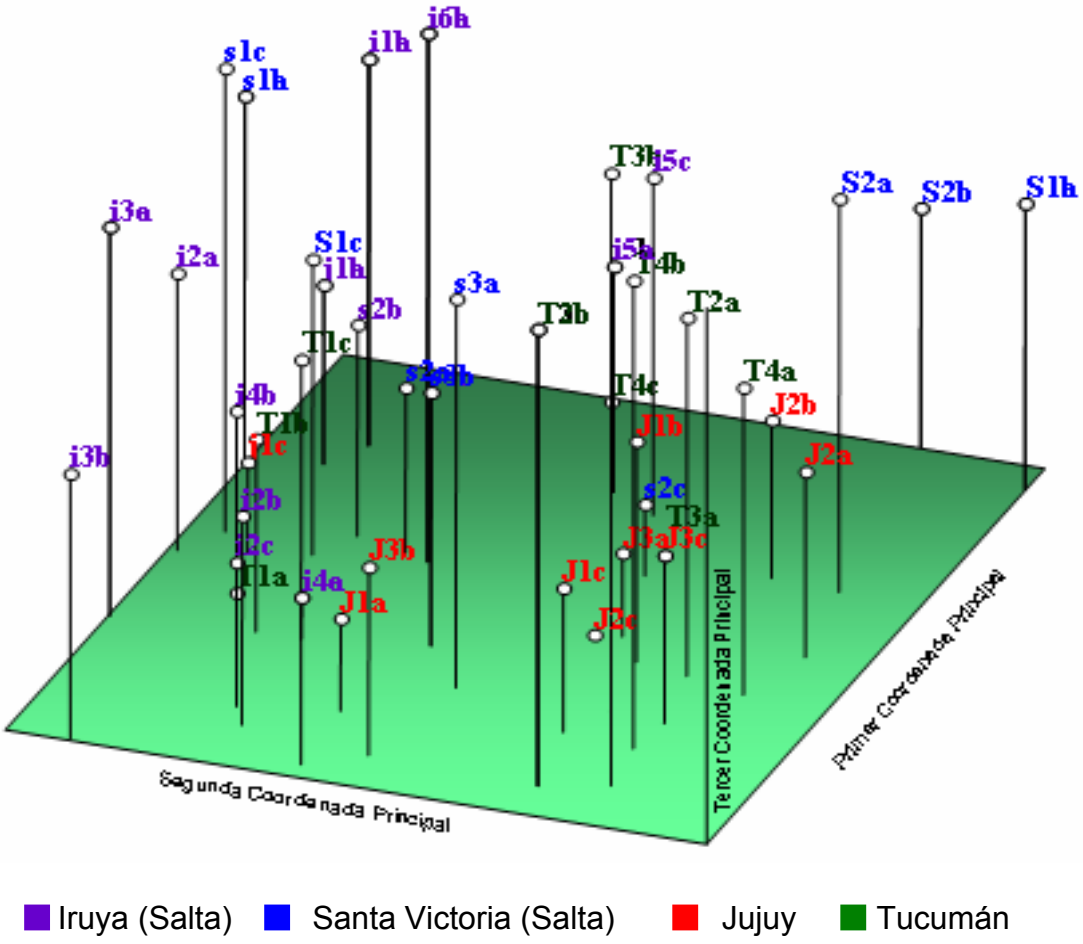
Coord. Principal	Eigenvalor	%	% Acumulado
1	3.50769814	20.7818	20.7818
2	2.85169559	16.8952	37.6770
3	2.10730431	12.4850	50.1620
4	1.72246967	10.2050	60.3670

Figura 4.2. Fenograma de 57 individuos pertenecientes a muestras de porotos silvestres y primitivos procedentes de tres provincias del NOA analizadas empleando marcadores ISSR y aplicando el coeficiente de Jaccard. (CCC: 0.766)



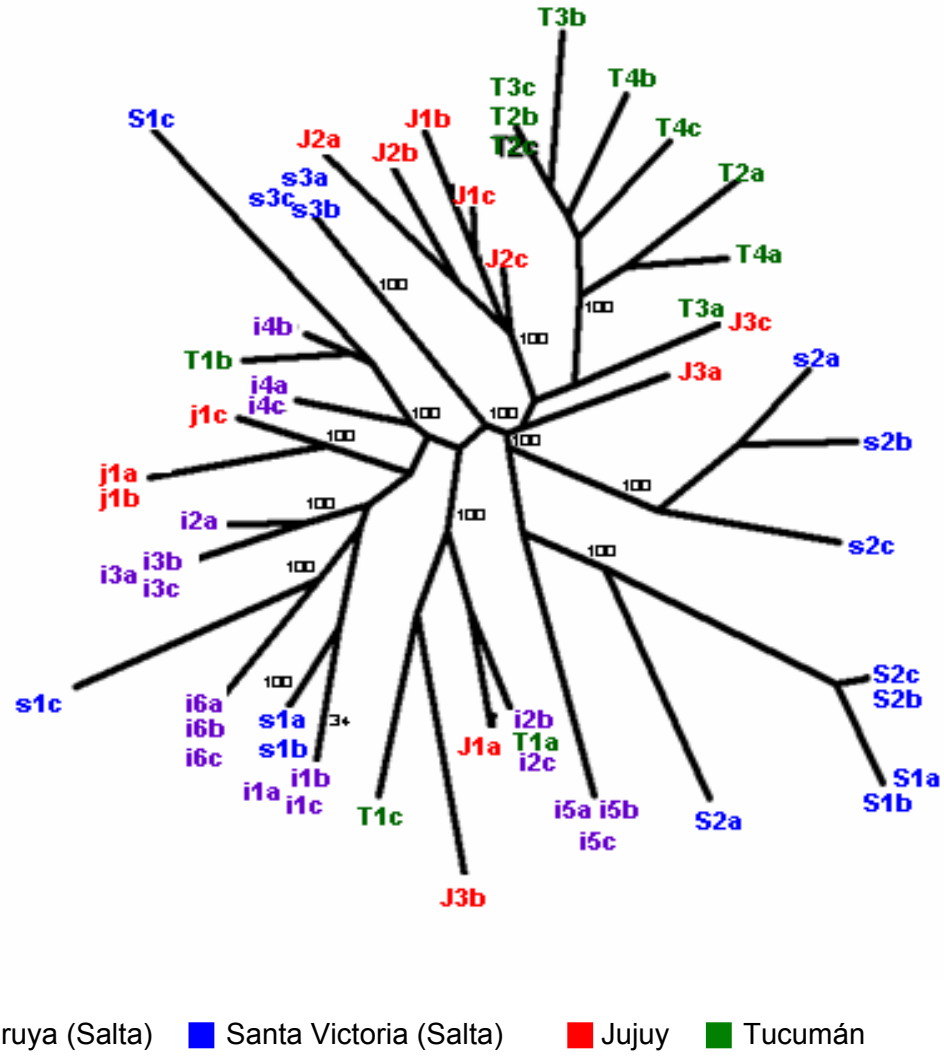
En el Análisis de Coordenadas Principales se observa la distribución de las muestras silvestres hacia la derecha del gráfico y de las primitivas hacia la izquierda, sin embargo la separación de los grupos no es muy clara (Figura 4.3). Las muestras silvestres de Salta se ordenan en el cuadrante derecho hacia atrás, excepto el individuo silvestre S1c de Santa Victoria, que mostró gran similitud con las muestras primitivas de esa zona. Por otro lado, se observó que la muestra silvestre T1 de Tucumán también presenta mayor similitud con las muestras primitivas.

Figura 4.3. Análisis de Coordenadas Principales de 57 individuos pertenecientes a muestras de porotos silvestres y primitivos de tres provincias del NOA, analizados mediante ISSR. (Total de la variabilidad representada: 50,16%)



En la Figura 4.4 se presenta el árbol de Neighbor Joining obtenido a partir de la matriz de similitud de Jaccard. Hacia arriba se observa un grupo integrado por las muestras silvestres de Jujuy y Tucumán, que forman un agrupamiento con elevada similitud genética entre individuos, a excepción de los individuos T1c, T1a, J3b y J1a que forman un cluster menor con dos individuos primitivos de Iruya (i2c e i2b). Por otro lado el individuo T1b se asocia con la muestra i4 y con el individuo silvestre S1c, aunque este último se halla genéticamente muy diferenciado como lo indica la longitud de la rama del árbol.

Figura 4.4. Análisis de Neighbor Joining de 57 individuos pertenecientes a muestras silvestres y primitivas de poroto común procedentes de tres provincias del NOA.



La mayoría de los porotos primitivos se ubican en un mismo grupo independientemente de su procedencia geográfica. Asimismo se observa una clara asociación de los individuos de cada muestra entre sí, con excepción de aquéllos de las muestras s1, i2 e i4. Abajo hacia la derecha, las muestras silvestres de Santa Victoria (Salta) se agrupan con la muestra primitiva s2 de la misma localidad y con la muestra i5 de Iruya.

La mayor parte de los grupos descriptos presentan elevados valores de soporte, alcanzando la mayoría el 100% con bootstrap de 1000 réplicas. Asimismo cabe destacar que las ramas más largas del árbol de Neighbor Joining corresponden a las muestras tanto silvestres como primitivas de Santa Victoria (Salta).

Aplicando el test estadístico de Mantel (1967) se observó una correlación altamente significativa pero de muy baja magnitud entre la matríz de similitud de Jaccard y las distancias geográficas existentes entre los sitios de recolección de las muestras poblacionales (r = 0,195; p< 0,01), como así también con las diferencias de altura entre los sitios (r =0,238; p< 0,01).

Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA).

El total de haplotipos obtenidos empleando los marcadores ISSR fue de 37 (Tabla 4.D). Las muestras silvestres mostraron un mayor número de haplotipos que las primitivas. En todas las muestras silvestres se registró más de un haplotipo diferente; en las muestras primitivas, en cambio, sólo el 60% incluye más de un haplotipo, de modo que en el 40% no se registraron diferencias intra -muestra.

Tabla 4.D. Haplotipos obtenidos por muestra empleando marcadores ISSR.

Silvestres		Primitivos	
Muestra	**Haplotipos**	**Muestra**	**Haplotipos**
J1	17, 18, 19	i1	1
J2	20, 21, 22	i2	2, 3
S1	23, 24	i3	3,4
S2	25, 26	i4	12, 13
J3	27, 28, 29	i5	15
T1	3, 30, 31	i6	16
T2	32, 33	s1	7, 8
T3	29, 34, 33	s2	9, 10, 11
T4	35, 36, 37	s3	14
		j1	5, 6
Total	24		17

El análisis de la varianza molecular mostró una variación significativa entre muestras silvestres y primitivas (ϕ_{st}= 0,0186; p<0,001), sin embargo más del 90% de la variabilidad se debió a diferencias dentro de cada uno de estos grupos.

También se halló variación significativa entre distintos sitios de recolección (Santa Victoria, Iruya, Jujuy y Tucumán) (Tabla 4.E). Sin embargo, el componente de la varianza que mostró mayor valor fue la variación entre individuos dentro de los sitios (78,15% de la variación total), lo que coincide con los resultados obtenidos en los capítulos anteriores.

Tabla 4.E. Resultados del análisis molecular de la varianza existente en las muestras de porotos silvestres y primitivas estudiadas.

Fuente de variación	% de la varianza total	P	Estadístico ϕ
Entre grupos de muestras	21,85 %	<0,001	ϕ_{st} = 0,2185
Dentro de grupos	78,15%		

DISCUSIÓN

El análisis conjunto de los fingerprints de las muestras de porotos primitivos y silvestres generados con “primers” ISSR permitió identificar 37 patrones de amplificación únicos que diferenciaron el 42% de los individuos de las distintas muestras.

Tanto los análisis de agrupamientos como el de Coordenadas Principales revelan que existe una separación clara entre grupos de muestras silvestres y grupos de muestras primitivas (esto se observa principalmente en el fenograma).

Las muestras primitivas se asocian entre sí a valores de similitud similares a los observados para las muestras silvestres de Jujuy y Tucumán (seis sitios de recolección), a pesar de que son porotos domesticados provenientes de tres sitios bastante próximos (Iruya, Santa Victoria y Tilcara). Esto revela que los porotos primitivos del NOA estudiados tienen una elevada variabilidad genética, probablemente favorecida por el intercambio de materiales entre los agricultores de la zona y/o la fecundación cruzada con formas silvestres. Resultados similares fueron observados en poblaciones silvestres y primitivas de México analizadas con marcadores ISSR (González *et al.*, 2005).

Por otra parte cabe consignar que, como se observó en el capítulo tres, la mayoría de los porotos primitivos se asocia por muestra o número de entrada, siendo dichas muestras representativas de distintos tipos de porotos cultivados en la zona, que se diferencian principalmente por el tamaño y el color del tegumento de la semilla (ver Figura 3.4)

La muestra silvestre genéticamente más similar al grupo de muestras primitivas es la T1b de Tucumán (Trancas), tanto en el fenograma como en el árbol de Neighbor Joining. En el Análisis de Coordenadas Principales (Figura 4.3) este

individuo se ubica justo en el centro del gráfico, entre los porotos primitivos (la mayoría hacia la izquierda) y los cultivados (la mayoría hacia la derecha). Cabe suponer que el genotipo de T1b es intermedio entre formas silvestres y primitivas y tal vez sea producto de un cruzamiento entre ellas. Algo similar sucede con el individuo S1c de Santa Victoria, que en todos los resultados obtenidos (UPGMA, árbol de NJ y ACOORP) forma parte del grupo de muestras primitivas, entre las cuales hay una de la misma localidad (s3). Estudios de la descendencia obtenida a partir de estos individuos serían necesarios para corroborar esta hipótesis.

La muestra primitiva s2, que en análisis anteriores (Ver Capítulo 3) mostró menor similitud genética con el resto de las muestras primitivas analizadas, se ubica por fuera de los agrupamientos principales en el fenograma (Figura 4.2) y en el árbol de NJ (Figura 4.4) se relaciona con porotos silvestres del mismo sitio (S1 y S2). Tanto la muestra s2 como S1 y S2 presentan gran divergencia genética entre sus individuos, evidenciada por el largo de las ramas del árbol.

En la descendencia de la muestra s2 Menéndez Sevillano (Comunicación personal), observó una gran variabilidad y segregación de caracteres de tipo silvestre, como por ejemplo vainas dehiscentes, menor tamaño de la semilla y patrón moteado, lo que confirmaría la existencia de hibridación con porotos silvestres, hipótesis sugerida por los resultados de los análisis moleculares aquí presentados.

El flujo génico ocurre cuando hay migración de individuos (por ejemplo, de semillas) o gametas (por ejemplo polen) entre poblaciones, y junto con la deriva génica, la selección y la mutación, representa una de las principales fuerzas evolutivas responsable de cambios en las frecuencias génicas de las poblaciones. La intensidad y el efecto del flujo génico y la introgresión entre formas silvestres y domesticadas es muy variable y depende de la historia evolutiva de la especie, del

ambiente (espacio y tiempo), de la localización de los genes en el genoma (relación entre genes del síndrome de domesticación), del agroecosistema y de la actividad humana (Papa y Gepts, 2005).

Según lo descripto por Menéndez Sevillano (2002) en la localidad de Los Toldos, departamento de Santa Victoria, los aborígenes cultivan junto con los porotos primitivos, las variedades silvestres que ellos "bajan" de sitios de difícil acceso en la selva del Parque Nacional Baritú (provincia de las Yungas), pudiéndose observar posteriormente tipos intermedios (como la muestra s2), los cuales son justificados por los agricultores lugareños, quienes expresan que "al traer el poroto zorro (uno de los nombres que le dan a la forma silvestre) de Baritú, a Los Toldos, se engorda". De este modo la intervención del hombre estaría favoreciendo el flujo de genes desde las poblaciones silvestres hacia las domesticadas, dando lugar a un incremento de la variabilidad genética en algunas poblaciones de porotos primitivos.

Las muestras de porotos silvestres de Salta presentan un mayor peso de semilla comparado con el resto de las muestras silvestres (Tabla 4.F). Esto podría deberse al flujo génico con porotos domesticados. El incremento en el tamaño de la semilla en los porotos silvestres también fue observado por otros autores, quienes señalan que el aumento es inversamente proporcional a la distancia que separa las poblaciones silvestres y los cultivos (Papa y Gepts, 2003; Payró *et al.*, 2005). Un análisis más detallado de la existencia de posibles factores que favorecen el flujo génico entre los porotos domesticados y silvestres, por ejemplo los insectos polinizadores, y de las características genéticas de poblaciones primitivas y silvestres separadas a mayor o menor distancia, permitiría establecer una correlación de gran utilidad para corroborar esta hipótesis.

En lo que respecta a los resultados de los estudios moleculares y su

comparación con aquéllos obtenidos a partir de estudios mediante caracteres morfoagronómicos, caber consignar algunas diferencias. En el fenograma basado en caracteres morfológicos de semilla, hoja y vaina (Tabla 4.F), publicado por Menéndez Sevillano (2002) se observa que las muestras silvestres forman un grupo, quedando excluidas del mismo sólo T3 y T4. Sin embargo las muestras primitivas no forman un grupo y se ubican por fuera de las silvestres a bajos niveles de similitud, excepto i6. El Análisis de Componentes Principales indica que los caracteres que contribuyen a la separación de las muestras silvestres y primitivas sobre el primer eje son: largo de semilla, ancho de semilla y largo de vaina (Ver Anexo 5, pág. 183). Por lo contrario, en el fenograma basado en marcadores ISSR la mayoría de las muestras primitivas se asocian en un mismo grupo, lo que podría estar indicando un origen común no expresado en la morfología. Existen evidencias que sugieren la existencia de un único evento de domesticación en la región Andina, a partir de una población silvestre de la zona del sur de Perú, Bolivia o Argentina, produciéndose una divergencia posterior a la domesticación debido principalmente a la selección realizada por los agricultores de las diferentes regiones (Khairalla *et al.*, 1992; Beebe *et al.*, 2001; Chacón *et al.*, 2005).

Las relaciones de similitud entre muestras no son coincidentes en los fenogramas morfológico y molecular. Esta falta de coincidencia podría deberse a que los marcadores ISSR no están sujetos a influencia ambiental y no se relacionarían con genes que codifican para los caracteres morfológicos analizados, sujetos a selección natural y artificial.

Ambos resultados, el análisis morfológico de Menéndez Sevillano (2002) y el aquí presentado sobre la base de marcadores ISSR, avalan la hipótesis de que existe una elevada variabilidad en muestras primitivas del NOA, la cuál no había sido

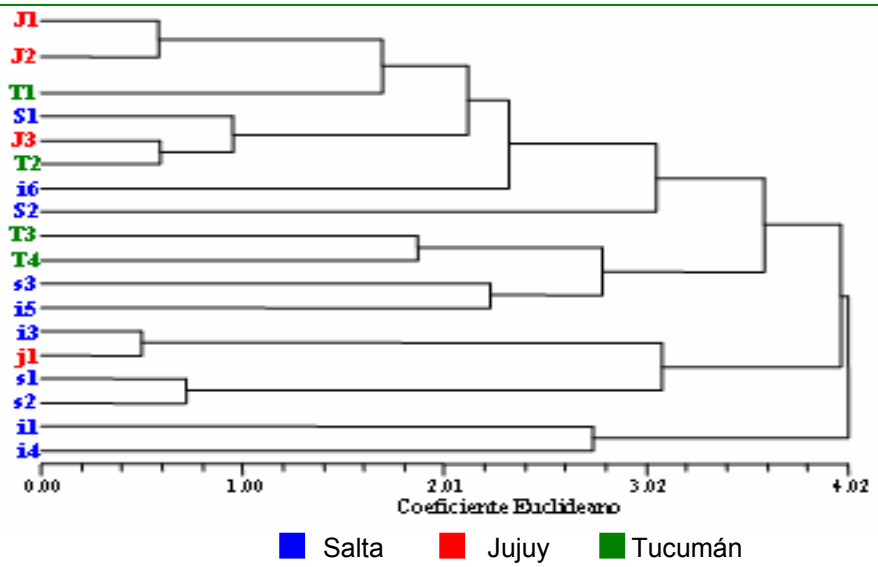
detectada sobre la base de otros marcadores (por ejemplo faseolinas).

Tabla 4.F. Caracteres morfológicos de 18 muestras silvestres y primitivas de poroto común, procedentes de tres provincias del NOA. Cada valor representa el promedio de diez plantas (Menéndez Sevillano, 2002).

	Código de entrada	Semilla			Peso 100 semillas (g)	Hoja		Vaina		
		largo (mm)	ancho (mm)	grosor (mm)		Largo (mm)	ancho (mm)	largo (mm)	ancho (mm)	grosor (mm)
	Silvestres									
J1	VAV-6362	8.64	5.26	2.91	11.0	51.5	27.6	78.4	7.2	6.3
J2	VAV-6363	7.62	5.03	2.86	9.0	43.3	21.4	76.1	6.8	6.1
J3	VAV-6366	7.85	4.91	2.93	10.0	42.3	21.4	69.9	6.1	5.3
S1	VAV-6364	5.27	5.63	3.74	13.0	34.6	18.2	89.4	7.4	5.7
S2	VAV-6365	7.71	5.16	2.90	14.0	36.5	17.6	86.0	7.4	6.4
T1	VAV-6368	7.70	4.80	2.84	9.0	41.2	20.9	72.9	6.4	5.2
T2	VAV-6369	7.48	4.68	2.78	10.0	33.4	16.5	78.0	6.7	4.7
T3	VAV-6370	7.05	4.59	3.03	11.0	34.0	15.9	74.3	7.0	4.2
T4	MCM-146	7.40	4.66	2.47	7.0	59.0	37.0	57.4	7.2	4.1
	Primitivos									
i1	VAV3716G	13.30	8.30	5.90	46.92	7.41	5.13	11.44	15.10	9.80
i2*	VAV3716T	12.30	7.30	5.60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
i3	VAV3716U	14.00	8.10	5.70	44.67	7.40	4.45	10.47	10.50	9.00
i4	MCM69-A	12.00	7.38	5.83	37.00	12.92	8.85	13.49	9.76	5.65
i5	MCM109	10.50	6.54	5.05	42.00	11.62	8.73	12.31	9.48	6.17
i6	MCM110	10.78	8.41	6.76	46.00	12.37	7.76	9.57	10.8	7.23
j1	VAV3716D	13.30	8.00	5.80	43.56	8.02	4.91	11.78	11.10	8.00
s1	VAV5867	12.80	7.40	6.07	48.00	10.52	7.96	12.24	8.94	6.00
s2	MCM18	14.50	8.07	6.20	44.00	11.36	9.67	13.21	9.24	6.90
s3	MCM79-A	12.19	6.97	5.91	48.00	12.85	8.87	7.43	7.00	4.20

*la muestra i2 no se incluyó en el análisis por presentar gran cantidad de datos faltantes, n.d.: no determinado.

Figura 4.4. Fenograma de caracteres morfológicos de 18 muestras silvestres y primitivas de poroto común procedentes de tres provincias del Noroeste Argentino, empleando el coeficiente de distancia Euclideano.



Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA).

La subdivisión de la varianza observada en el AMOVA indica que la diferenciación entre muestras silvestres y primitivas es baja (ϕ_{st}= 0,0186), con una mayor variabilidad entre las muestras dentro de ambos grupos, lo que estaría de acuerdo con lo observado en los resultados de los análisis de agrupamientos y de Coordenadas Principales y con lo observado por González *et al.* (2005) en poblaciones de porotos mesoamericanos.

La elevada variabilidad de las poblaciones silvestres y primitivas del NOA es coincidente con resultados de estudios previos realizados en base a caracteres morfológicos que determinaron la existencia de gran variabilidad en dichas muestras (Menéndez Sevillano, 2002; De Ron *et al.*, 2004).

Por otro lado, la diferenciación entre individuos de distintos sitios de recolección también fue significativa, indicando que existe una subdivisión de la variabilidad a nivel latitudinal y de altitud, como también se observó en el test de Mantel, aunque con bajos valores de correlación. Como se discutió en capítulos anteriores, estos resultados se deben a que existiría estructuración geográfica de la variabilidad genética de las poblaciones silvestres favorecida por el aislamiento geográfico, el cual habría conducido al mantenimiento de genotipos y morfologías distintivas en cada área, ya que las poblaciones primitivas no muestran esta estructuración reflejando en cambio la selección artificial realizada por el hombre.

En el AMOVA el 78,15% de la variabilidad total se debe a diferencias entre individuos dentro de los sitios. Estos resultados coinciden con la idea de la existencia de flujo génico entre los grupos de muestras de porotos silvestres y domesticados, ya que el principal efecto del flujo génico es la reducción de la diferenciación entre poblaciones (variación interpoblacional), acompañada por un

incremento de la variación intrapoblacional (Papa y Gepts, 2005). Sin embargo son necesarios estudios considerando un mayor número de individuos para corroborar esta hipótesis. Cabe aclarar que no se analizaron poblaciones primitivas de Jujuy y Tucumán lo que sería de gran interés.

Los complejos intermedios ("wild-weedy-cultivated") que se generan por la existencia de flujo génico entre porotos silvestres y domesticados muestran una gran variabilidad y sugieren la existencia de compatibilidad en los cruzamientos. Sin embargo es necesario realizar mayores estudios sobre la fertilidad de los híbridos para comprobar esta hipótesis. Asimismo, el estudio en mayor profundidad de estos complejos resulta de gran interés, por su incidencia en futuros programas de mejoramiento que permitirán transferir caracteres útiles desde las variedades silvestres y primitivas a las comerciales, ya que podrían emplearse como intermediarios. Por ejemplo, el carácter de resistencia a la macha angular presente en la muestra silvestre T3 (VAV-6370) de Tucumán, no está presente en las variedades comerciales. De este modo el aprovechamiento de la variabilidad existente en los porotos silvestres y primitivos contribuiría a ampliar la base genética de los cultivares comerciales.

CONCLUSIONES

✓ Se observó una diferenciación significativa entre los grupos de muestras poblacionales de porotos silvestres y primitivos estudiados, reflejada tanto en los análisis de agrupamientos como en el AMOVA.

✓ El análisis de la varianza molecular reveló una diferenciación significativa entre grupos de muestras de sitios de recolección diferentes también indicando que existe una subdivisión de la variabilidad a nivel latitudinal y de altitud.

✓ La gran variabilidad observada dentro de los sitios de recolección sugiere la existencia de flujo génico entre los porotos primitivos y silvestres estudiados. La intervención del hombre estaría favoreciendo el flujo de genes desde las poblaciones silvestres hacia las domesticadas, dando lugar a un incremento de la variabilidad genética en algunas poblaciones de porotos primitivos. El estudio en mayor profundidad de estos cruzamientos resulta de gran interés, por su incidencia en el aumento de la variabilidad genética de las poblaciones y sus implicancias en futuros programas de mejoramiento.

✓ El flujo génico entre las poblaciones silvestres y domesticadas sería responsable del surgimiento de complejos intermedios (“wild-weedy-cultivated”) que presentan gran variabilidad y serían de interés para el mejoramiento.

✓ Los marcadores moleculares y los caracteres morfológicos reflejaron la gran variabilidad existente en las muestras de porotos primitivos y silvestres del NOA, sin

embargo las relaciones entre muestras reveladas por ambos tipos de datos no coincidieron.

✓ Los marcadores ISSR demostraron ser muy eficientes en la identificación de las muestras silvestres y las domesticadas, distinguieron entre muestras simpátricas, identificando polimorfismos dentro de muestras, y además detectaron individuos resultantes de potenciales entrecruzamientos entre poblaciones silvestres y primitivas.

CAPÍTULO 5

Anexos

Importancia económica del poroto común

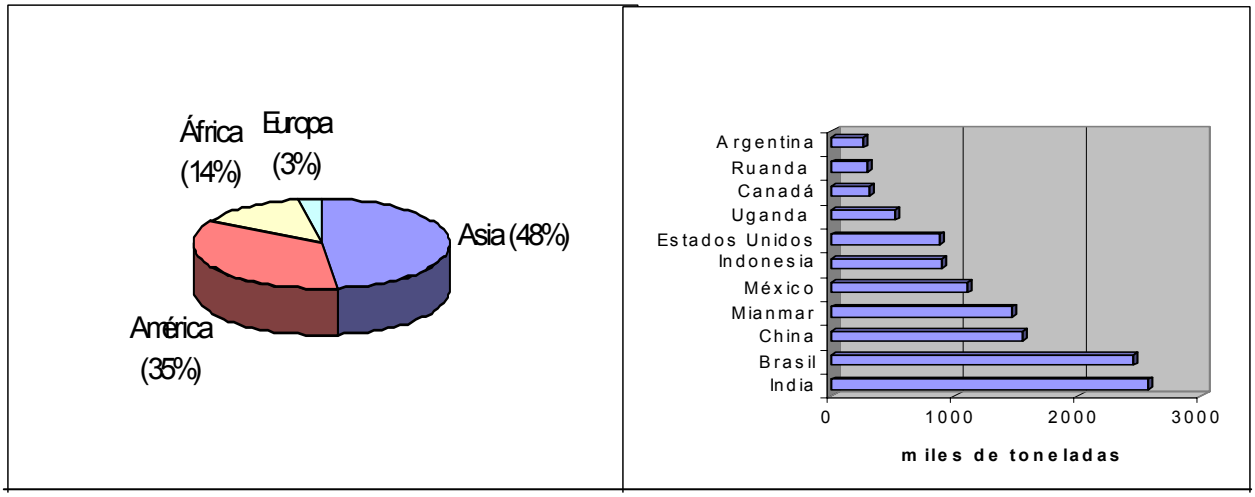
Situación mundial

La producción mundial de porotos secos en los últimos años fue de 16,4 a 17,5 millones de toneladas, con un rendimiento que osciló entre los 500 y 2000 kilogramos por hectárea (kg/ha) (Tabla 5.A; Figura 5.1).

Tabla 5.A. Superficie y producción mundial de porotos (FAO 2006)

Año	Superficie (miles de ha)	Producción (miles de t)
1996	25.084	17.082
1997	24.727	16.409
1998	24.001	16.663
1999	24.259	17.460
2000	24.138	17.152
2001	23.241	16.772
2005	22.250	17.195

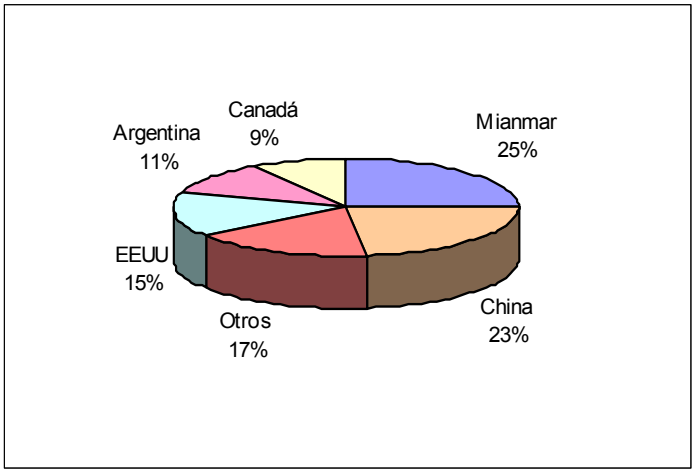
Figura 5.1. Proporción de la producción mundial y principales países productores.



Las exportaciones mundiales son del orden de los 1,8 a 2,5 mill de t. Los 5 principales países exportadores participan con más del 80% del volumen total.

Dentro de estos países China y Mianmar rondan el 50%. En el caso del poroto alubia EEUU, Canadá y Argentina son los principales exportadores (Figura 5.2).

Figura 5.2. Principales países exportadores de poroto



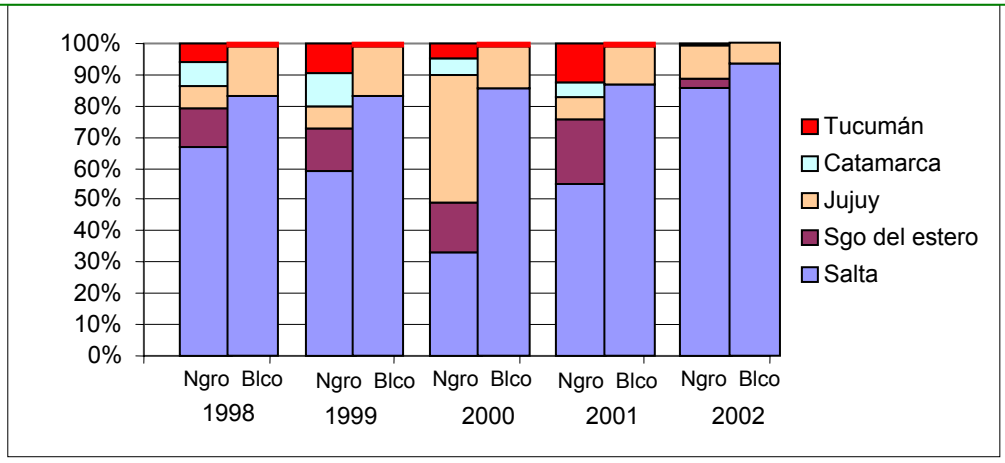
El mayor consumo de poroto se da en los países en vías de desarrollo. Los países africanos son los que presentan los valores más altos superando los 30 kg por habitante por año (Uganda, Ruanda, Burundi). En América el consumo mayor lo tienen los países que tienen a esta leguminosa incluida en sus dietas como parte de sus costumbres como Brasil (25kg/hab/año) y México (12 kg/hab/año). Los países europeos consumen en promedio 1,8 kg/hab/año. Argentina estaría entre los 110 y 150 gr/ha/año (Tubello y Piccolo, 2002).

Mercado Local

En la campaña 2002 la superficie sembrada de porotos secos fue de 240 mil hectáreas, estimándose una producción de 252 mil toneladas, distribuidas según tipos de porotos en: 51% porotos tipo blancos, 41% porotos tipos negro, 8% otros porotos. El 94% del total sembrado para poroto blanco se ubicó en la provincia de

Salta (115 mil ha) mientras que para poroto negro este porcentaje fue de 54% (Figura 5.3).

Figura 5.3. Contribución a la producción nacional de las principales provincias productoras de porotos negros y blancos (Tubello y Piccolo, 2002).



En América las leguminosas y especialmente el poroto, dada su riqueza nutricional, se ha constituido en la base de la alimentación de los pueblos precolombinos. En su composición química se destaca fundamentalmente el aporte en proteínas cuyos valores oscilan entre 23-28 g%. mientras que alimentos como el arroz, trigo y maíz (cereales) poseen un 12 g%, superan a la carne (20 g%), pescado (18 g%) y leche (3 g%), sin embargo el aporte de la soja es según la variedad de 38-50 g%. Son fuente importante de hidratos de carbono con valores que oscilan entre 56-58 g% aunque son menos asimilables que los cereales ya que los superan en contenido de fibra bruta. El aporte de grasa es de 1 a 1,6 g%. En cuanto a minerales son buena fuente de calcio, hierro y fósforo, en vitaminas Tiamina, Riboflavina y Niacina (grupo B) (Fili, 2002).

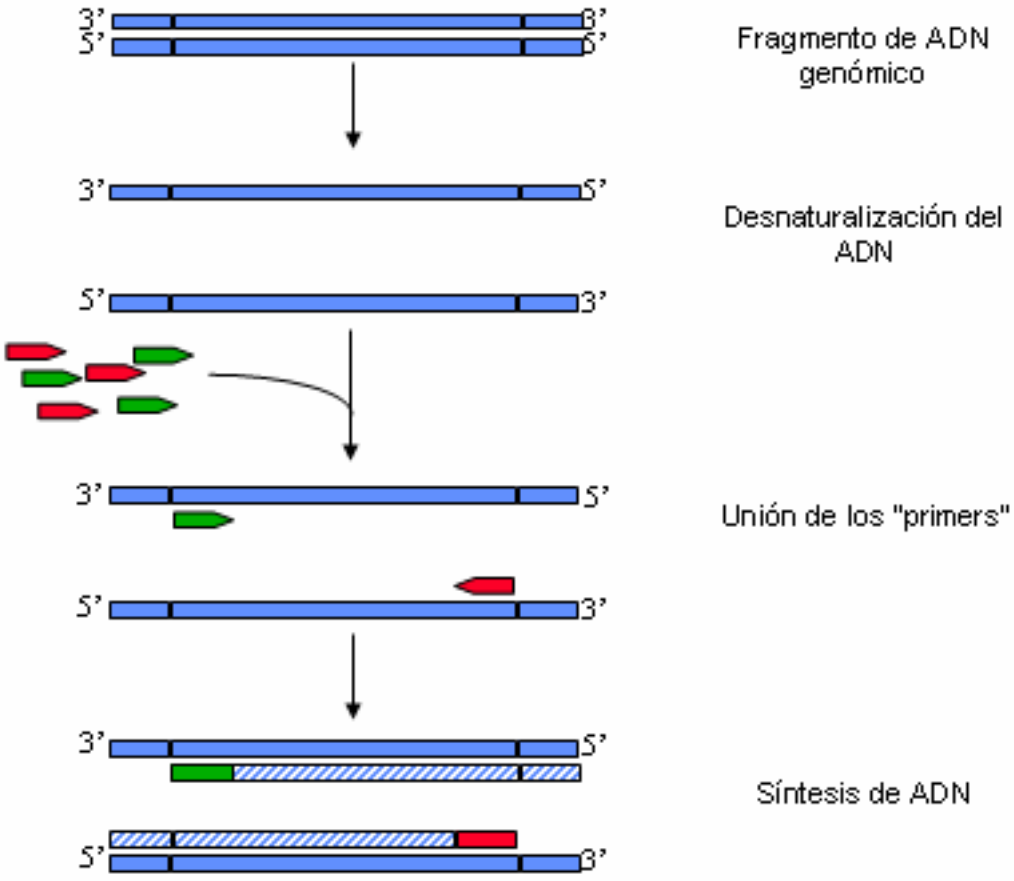
Anexo 2

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR creada por Kary Mullis en la década del 80 (Saiki *et al*., 1985; Mullis y Faloona, 1987), consiste en la síntesis enzimática de millones de copias de un fragmento de ADN, en presencia de la ADN polimerasa, un par de oligonucleótidos utilizados como iniciadores o "primers" y una secuencia de ADN de doble cadena. Los "primers" son sintetizados artificialmente de manera que las secuencias de nucleótidos determinan el tipo de amplificación que se realizará.

Un gran avance en el empleo de la técnica de PCR ocurrió con el descubrimiento de una polimerasa termoestable extraída de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* (*Taq* polimerasa) (Saiki *et al*., 1985). Esta enzima es una proteína estable a 93ºC (temperatura de desnaturalización del ADN), y además presenta una actividad máxima entre 72-80ºC. La amplificación se produce porque se suceden 40 ciclos con cambios de la temperatura en presencia de un exceso de *Taq* polimerasa y oligonucleótidos (Alberts *et al.,* 1994). Una limitación de la *Taq* polimerasa es que carece de actividad exonucleasa 3'-5' (proofreading) y tiene una tasa de error de $2x10^{-4}$ nucleótidos por ciclo, con una frecuencia total de error de 0,25% en una amplificación de 30 ciclos. Para la mayoría de las amplificaciones esta tasa de error no representa un gran problema. Existen otros tipos de enzimas que poseen actividad exonucleasa 3'-5' como ser: *Pfu* ADN polimerasa (aislada de *Pyrrococcus furiosus*) y *Pwo* ADN polimerasa (aislada de *Pyrrococcus woesei*) (Dieffenbach y Dveksler, 1995).

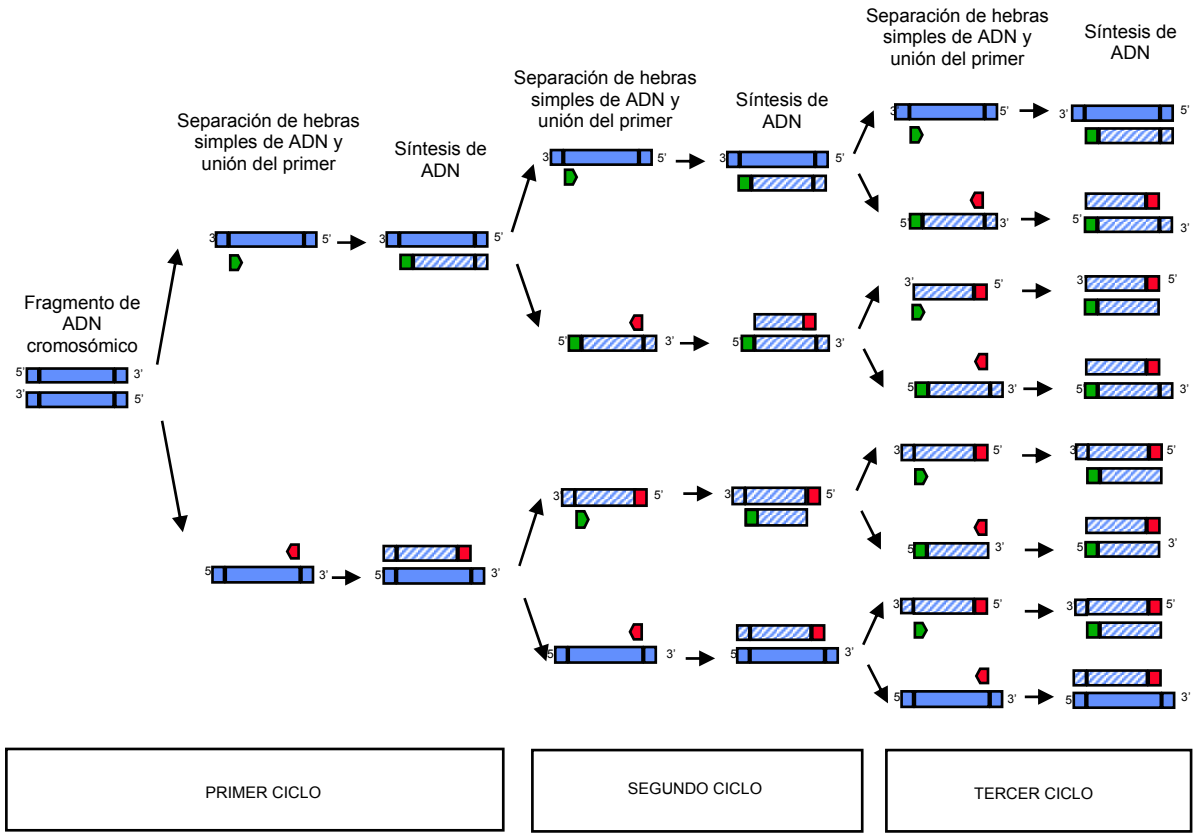
Figura 5.4. Reacción en cadena de la polimerasa. Etapas en un ciclo de amplificación de ADN.



La síntesis de ADN se puede resumir en tres etapas (Figura 5.4): desnaturalización del ADN, apareamiento (annealing) del “primer" o iniciador con las hebras de ADN y síntesis de las nuevas cadenas de ADN. La doble cadena de ADN se desnaturaliza al elevar la temperatura a 92-95ºC, porque esta temperatura está muy por encima del T_M (melting temperature) del ADN. El T_M es la temperatura en la que se rompen las uniones entre las bases y se separan las hebras de ADN de cadena simple para servir de blanco en la etapa posterior. En la etapa de

apareamiento, la temperatura se reduce rápidamente permitiendo la hibridación de cada “primer" con las secuencias complementarias que flanquean la región blanco. La temperatura de apareamiento depende del tamaño y secuencia del “primer" utilizado. Luego, la temperatura se eleva a 72ºC para que la enzima ADN polimerasa realice la extensión a partir de cada extremo 3` de los “primers", adicionando nucleótidos en sentido 5’-3’, tomando como molde la secuencia de ADN blanco. Se obtiene así una copia de ADN molde, al finalizar cada ciclo. Si estos ciclos se repiten en presencia de “primers" y enzima en exceso, se produce un aumento exponencial de la cantidad de ADN (Figura 5.5). Esto permite obtener luego de 30 ciclos casi 300 millones de copias (2^{28}) de una secuencia de ADN (Brown, 1995).

Figura 5.5. Amplificación de ADN por PCR. (Alberts *et al.*, 1994)



Anexo 3

Faseolina

Las proteínas presentes en las leguminosas pueden clasificarse de acuerdo a su solubilidad en:

- Albúminas: solubles en agua y soluciones salinas diluidas, incluye la mayoría de las enzimas de la semilla y representa del 10 al 20% de la fracción proteica.
- Globulinas: solubles en soluciones salinas, corresponde al 70% de la fracción proteica, son proteínas de almacenamiento o reserva, son sintetizadas durante la formación de semillas para ser usadas durante la germinación como fuente de nitrógeno. Presentan gran cantidad de ácido aspártico, ácido glutámico, leucina, aminoácidos básicos y amidas.
- Prolaminas: solubles en etanol representan menos del 5% de la fracción proteica.
- Glutelinas: Son solubles en ácidos y bases corresponden al 15% de la fracción proteica.

Dentro de las Globulinas se encuentran las leguminas, con un coeficiente de sedimentación de 12S, y las vicilinas (7S). La **faseolina,** principal proteína de almacenamiento de la semilla en el poroto común, es una vicilina. Es una proteína oligomérica compuesta por tres subunidades polipeptídicas faseolina α, β y δ. El peso molecular de las subunidades va de los 43 a los 53 kDa. Las subunidades presentan heterogeneidad molecular atribuida a diferentes grados de glicosilación (Yeboah *et al.*, 1999), encontrándose diferentes tipos de faseolina en base a electroforesis en SDS/PAGE. La variabilidad observada la convierte en un marcador útil para estudios evolutivos y de domesticación ya que se encontraron diferentes tipos entre porotos silvestres y cultivados. También los tipos de faseolina permiten identificar porotos de diferente origen, mesoamericanos y andinos.

Anexo 4

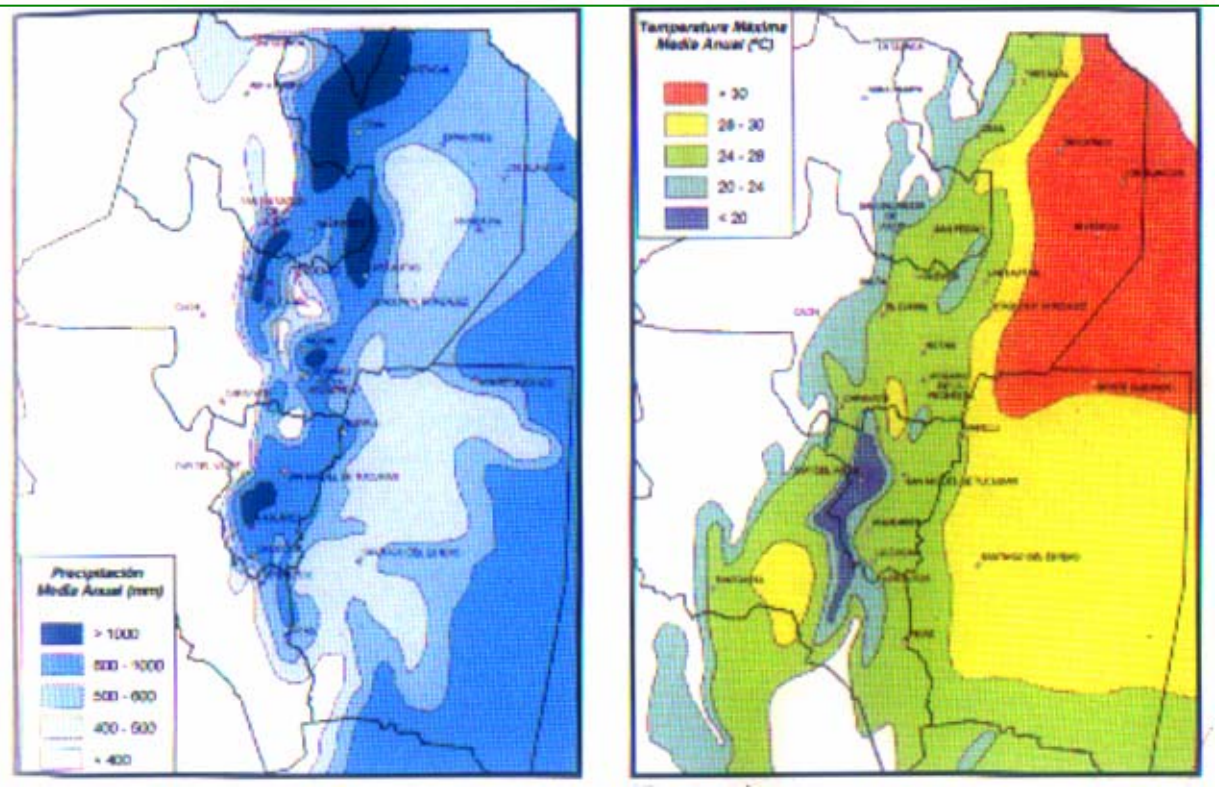
Condiciones ambientales en el Noroeste Argentino

El régimen de precipitaciones está relacionado con la topografía regional y varían desde los 400 a los 1000 mm anuales (Figura 5.6).

La variación anual de las precipitaciones muestra dos estaciones bien diferenciadas: una lluviosa que comienza en noviembre y finaliza en abril, recibe más del 90% del milimetraje total y otra seca desde mayo a octubre con precipitaciones escasas.

La distribución anual de temperatura es del tipo tropical-continental. Las temperaturas diurnas más elevadas ocurren en el mes de diciembre y las más bajas en junio, mientras que las nocturnas muestran el pico en el mes de enero y el piso en julio.

Figura 5.6. Precipitación media anual (mm) y temperatura máxima media anual (ºC) del NOA. (Nieva *et al.,* 2002)



Anexo 5

Análisis de Componentes Principales de caracteres morfológicos

A partir de los datos morfológicos de las muestras poblacionales analizadas aportados por la Dra. Menéndez Sevillano se realizó un Análisis de Componentes Principales. Se partió de la estandarización de la matriz básica de datos y se calculó la matriz de correlación entre caracteres empleando el coeficiente de correlación de Pearson. Se calcularon los eigenvectores (contribución de cada carácter a cada componente principal) y los eigenvalores (porcentaje de contribución de los componentes principales a la variabilidad total). Las OTU se proyectaron en el espacio delimitado por los componentes, graficándose los tres primeros componentes principales para las muestras silvestres, las primitivas y la combinación de ambas (Figuras 5.7 a 5.9). La contribución relativa de cada carácter para cada uno de los componentes principales se muestra en las Tablas 5.B a 5.D. Para llevar a cabo el Análisis de Componentes Principales y generar los gráficos se utilizó el programa NTSYS-pc 2.02 (Rohlf, 1998).

Figura 5.7. Análisis de Componentes Principales de 9 muestras poblacionales de porotos silvestres empleando caracteres morfológicos (% de la variabilidad total: 1ºCP: 33,74%; 2ºCP: 24,87; 3ºCP: 20,61; Total: 79,22).

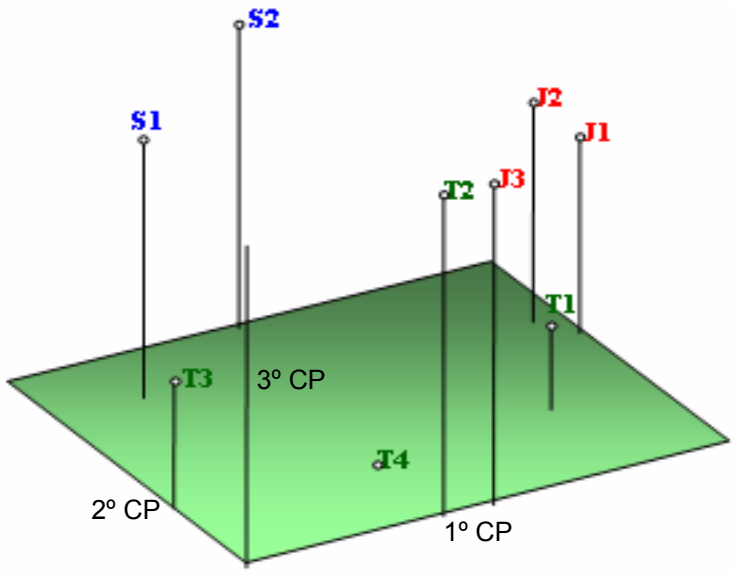


Tabla 5.B. Eigenvectores correspondientes a los tres primeros Componentes Principales representados en la Figura 5.7.

Caracteres	1º	2º	3º
Largo de semilla	0.5029	0.5627	0.2425
Ancho de semilla	-0.3363	**0.7407**	-0.2461
Grosor de semilla	-0.5925	0.4182	0.4345
Peso de 100 semillas	0.1580	-0.5229	**-0.6569**
Largo de hoja	-0.4804	**-0.7757**	0.0240
Ancho de hoja	0.1497	0.5511	**-0.6157**
Largo de vaina	**-0.9086**	-0.0260	0.1725
Ancho de vaina	**0.8025**	0.2337	0.2484
Grosor de vaina	**0.6782**	-0.5453	0.3208

Figura 5.8. Análisis de Componentes Principales de 9 muestras poblacionales de porotos primitivos empleando caracteres morfológicos. (% de la variabilidad total: 1ºCP: 41,75%; 2ºCP: 29,87; 3ºCP: 12,49; Total: 84,11).

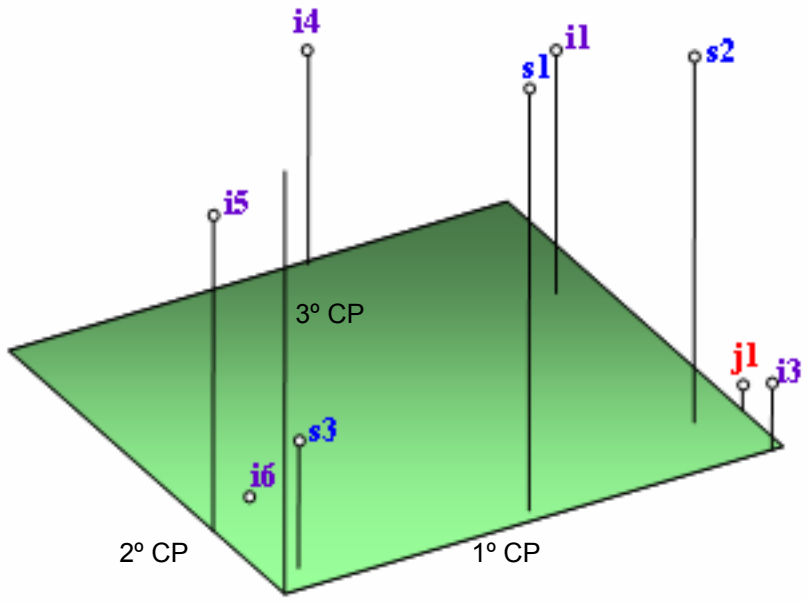


Tabla 5.C. Eigenvectores correspondientes a los tres primeros Componentes Principales representados en la Figura 5.8.

Carácter	1º	2º	3º
Largo de semilla	0.2166	**0.7789**	0.1499
Ancho de semilla	-0.3751	-0.5798	0.5659
Grosor de semilla	**0.8714**	-0.4519	0.0246
Peso de 100 semillas	-0.5931	**-0.6614**	-0.2265
Largo de hoja	**0.8628**	-0.3956	0.0779
Ancho de hoja	-0.3624	-0.5640	**0.5840**
Largo de vaina	-0.7420	0.5950	0.2494
Ancho de vaina	**0.8244**	-0.1312	0.0210
Grosor de vaina	-0.5944	-0.5079	-0.5656

Figura 5.9. Análisis de Componentes Principales de 18 muestras poblacionales de porotos silvestres y primitivos empleando caracteres morfológicos. (% de la variabilidad total: 1ºCP: 45,06%; 2ºCP: 19,36; 3ºCP: 16,73; Total: 81,15).

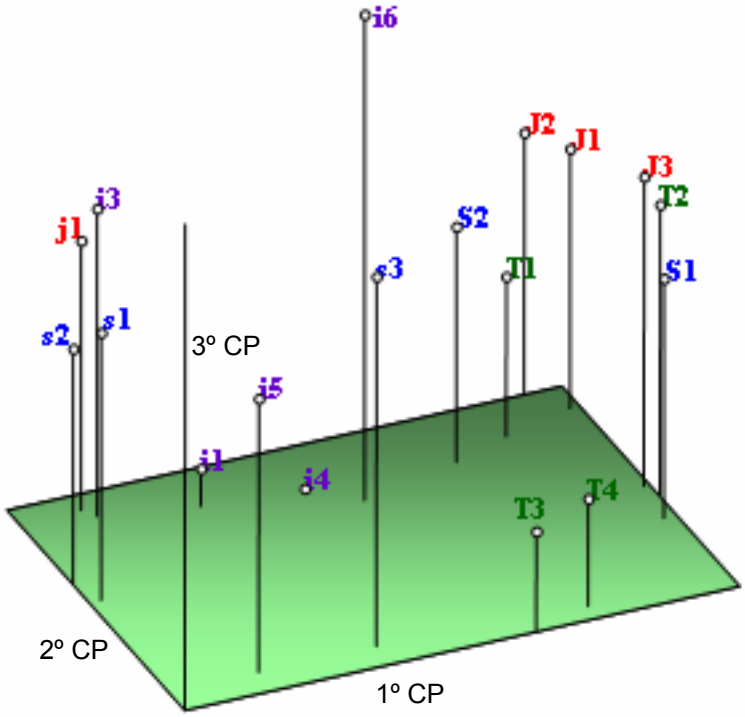


Tabla 6.D. Eigenvectores correspondientes a los tres primeros Componentes Principales representados en la Figura 5.9.

Carácter	1º	2º	3º
Largo de semilla	**0.8895**	0.2040	0.0027
Ancho de semilla	**-0.7014**	-0.0661	0.0437
Grosor de semilla	0.4896	**-0.7601**	-0.3532
Peso de 100 semillas	-0.5556	0.2636	**-0.6901**
Largo de hoja	0.4879	**-0.7575**	-0.3385
Ancho de hoja	-0.6622	-0.0726	-0.2142
Largo de vaina	**0.6930**	0.5921	0.0616
Ancho de vaina	-0.0514	**-0.8438**	0.0165
Grosor de vaina	0.2900	0.5469	**-0.6925**

CAPÍTULO 6

Bibliografía

Bibliografía

Adam-Blondon A, Sévignac M, Dron M. 1994. A genetic map of common bean to localize specific resistance genes against anthracnose. Genome 37:915-924.

Akagi H, Yokozeki Y, Imagaki A, Nkamura A y T Fujimura. 1996. A codominant DNA marker closely linked to the rice nuclear restorer gene, RF-1, identified with inter-SSR fingerprinting. Genome 39: 1205-1209.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y J Watson. 1994. Molecular Biology of the Cell. 3rd edition.Garland Publishing, Inc. New York. 1294p.

Allen O y E Allen. 1981. The Leguminosae- A source book of characteristics, uses and nodulation. The University of Wisconsin, pp 511-515.

Ariyaranthe H, Coyne D, Jung G, Skroch P, Vidaver A, Steadman J, Miklas P y M Bassett. 1999. Molecular mapping of disease resistance genes for halo blight, common bean bacterial blight, and bean common mosaic virus in a segregating population of common bean. J. Am. Soc. Hort. Sci. 124:654-662.

Arumuganathan K y E Earle. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Mol. Biol. Rep. 9:208-218.

Becerra-Velásquez V y P Gepts. 1994. RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in its centers of origin. Genome 37:256-263.

Beckmann J y M Soller. 1990. Towards a unified approach to genetic mapping of eukariotes based on sequence tagged microsatellite sites. Biotechnology 8:930-932.

Beebe S, Toro O, González A, Chacón M y D Debouck. 1997. Wild-weed-crop complexes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) in the Andes of Peru and Colombia, and their implications for conservation and breeding. Genet. Res. Crop Evol. 44:73-91.

Beebe S, Skroch P, Tohme J, Duque M, Pedraza F y J Nienhuis. 2000. Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. Crop Sci. 40:264-273.

Beebe S, Rengifo J, Gaitán E, Duque M y J Tohme. 2001. Diversity and origin of Andean Landraces of common bean. Crop Sci. 41:854-862.

Berglund-Brucher O y H Brucher. 1976. The south American wild bean (*Phaseolus aborigineus* Burk.) as ancestor of the common bean. Econ. Bot. 30:257-272.

Berry C y R Pratt. 1999. Biodiversidad. Suplemento de National Geographic, Febrero 1999.

Bornet B y M Branchard. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeats (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Mol. Biol. Rep. 19:209-215.

Botstein D, White R, Skolnick M y R Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Am. J. Hum. Genet. 32:314-331.

Black W. 1998. Fortran programs for the analysis of RAPD-PCR markers in populations. Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA. (ftp://lamar.colostate.edu/pub/wcb4/).

Blair M, Pedraza F, Buendía H, Gaitán-Solís E, Beebe S, Gepts P y J Tohme. 2003. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Theor. Appl. Genet. 107:1362-1374

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72:248-54.

Brookes A. 1999. The essence of SNPs. Gene 234:177-186.

Broughton W, Hernández G, Blair M, Beebe S, Gepts P y J Venderleyden. 2003. Beans (*Phaseolus spp*.)- model food legumes. Plant and Soil 252:55-128.

Brown J, Ma Y, Bliss F y T Hall. 1981. Genetic variation in the subunits of globulin-1 storage protein of French bean. Theor. Appl. Genet. 59:83-88.

Brown T.1995. Gene cloning, an introduction. Third edition. Chapman & Hall, London , UK. 334p.

Burkart A. 1941. Sobre la existencia de razas silvestres de *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus lunatus* en el norte argentino. Rev. Arg. Agron. 8:52.

Burkart A. 1943. Las leguminosas Argentinas silvestres y cultivadas. Editorial ACME S.A.C.I., Buenos Aires. 559p.

Cabrera A. 1971. Fitogeografía de la República Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. Vol 14. N°1-2. 58p.

Cabrera A y A Willink. 1980. Biogeografía de América Latina. Secretaría General de la Organización de los estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington. 123p.

Caetano-Anolles G, Bassam B y P Gresshoff. 1991. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Biotechnology 9:553-557.

Caicedo A, Gaitán E, Duque C, Toro O, Debouck D y J Tohme. 1999. AFLP fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from South America. Crop Sci. 39:1497-1507.

Caixeta Franco M, Alves Cassini ST, Rodriguez Oliveira V y S Mui Tsai. 2001. Caracterizacao da diversidade genética em feijao po meio de marcadores RAPD. Pesq. Agropec. Bras. 36, 381-385.

Cattan-Toupance I, Michalakis y Neema C. 1998. Genetic structure of wild bean populations in their South-Andean centre of origin. Theor. Appl. Genet. 96:844-851.

Chacón M, Pickersgill S y D Debouck. 2005. Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. Theor. Appl. Genet. 110:432-444.

Chin E, Senior M, Shu H y J Smith. 1996. Maize simple repetitive DNA sequences: Abundance and allele variation. Genome 39:866-873.

Crisci, J.V. y M.F. López Armengol. 1983. Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica. Monografía Nº26. Serie de biología. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico.Washington, D.C. 136p.

Crisci J, Morrone J y A Lanteri. 1993. El valor de la Diversidad Biológica: un enfoque holístico. En: Elementos de política ambiental, Goin y Goñi (eds.), Honorable Cámara de Diputados de la Provincia de Buenos Aires, La Plata, Argentina, pp 353-360.

Cubero J. 1999. Introducción a la mejora genética vegetal. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 365p.

Culasso A. 2005. Análisis de aplicabilidad de la técnica molecular RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) para estudios de diversidad en plantas del género Ilex". Tesina de Graduación de Licenciatura en Genética. Universidad Nacional de Misiones.

De Ron A, Menéndez Sevillano M y M Santalla. 2004. Variation in primitive landraces of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Argentina. Genet. Res. Crop Evol. 51:883-894.

Debouck D, Jara J, Siera A y J De La Cruz Rojas. 1987. Observations on the domestication of *Phaseolus lunatus* L. FAO/IBPGR Plant Genet. Res. Newsl. 70: 26-32.

Debouck D y J Tohme. 1988. Implicaciones que tienen los estudios sobre los orígenes del frijol común, *Phaseolus vulgaris* L., para los mejoradores de frijol. En: Temas actuales en mejoramiento genético del frijol común. Memorias del Taller Internacional de Mejoramiento Genético de Frijol, Beebe S (ed.), Cali, Colombia, pp 1-44.

Debouck D, Flores M, Ariola O y J Tohme. 1989. Presence of wild-weed-crop complex in *Phaseolus vulgaris* L. in Perú. Annu. Rep. Bean Improvement Coop. 32: 64-65.

Debouck D. 1991. Systematics and morphology. En: Common Beans: Research for Crop Improvement, van Schoonhover, A y O Voysest (eds.), CIAT-Centro Internacional de Agricultura Tropical. C.A.B.-Internacional. Wallingford, UK. pp 55-118.

Debouck D. 1999. Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean. En: Common bean improvement in the twenty-first century, Singh S. (ed.), Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp 25-52.

Debouck D. 2000. Biodiversity, ecology and genetic resources of Phaseolus beans-Seven answered and un answered questions. En: Proc. of the 7th MAFE Intl. workshop on genetic resources. Part I. Wild legumes, AFFRC and NIAR, Japan, pp 95-123.

Delgado Salinas A, Bonet A y P Gepts. 1988. The wild relative of *Phaseolus vulgaris* in Middle America. En: Genetic resources of Phaseolus beans, Gepts P (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holland, pp 163-184.

Dieffenbach C y G Dveksler. 1995. PCR Primer. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York,USA. 517p.

Doyle J J y J L Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15.

Duarte J, Santos J y L Melo. 1999. Genetic divergence among common bean cultivars from different races based on RAPD markers. Genet. Mol. Biol. 22:419-426.

Epimaki M, Koinange S, Shree P y P Gepts. 1996. Genetic control of the domestication syndrome in common bean. Crop Sci. 36:1037-1045

Escribano M, Santalla M, Casquero P y A De Ron. 1998. Patterns of genetic diversity in landraces of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Galicia. Plant Breed. 117:59-56.

Evans A. 1973. Commentary upon plant architecture and physiological efficiency in the field bean. En: Potential of field beans and other food legumes in Latin America, Wall D (ed.), CIAT,Cali, pp 279-286.

Evans A. 1976. Beans. En: Evolution of crops plants, Simmonds (ed.), Longman, London, pp 168-172.

Excoffier L., P. Smouse y J. Quattro, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes : application to human mitochondrial DNA restriction data. Geneticas 131: 479-491.

FAO 1999. Evaluación de la situación de la seguridad alimentaria mundial. Comité de seguridad alimentaria mundial FAO, Roma 31 mayo- 3 junio 1999. (http://www.fao.org/docrep/meeting/x1885S.htm#P62_1204)

FAO 2002. International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. (http://www.fao.org/ag/magazine/ITPGRe.pdf)

FAO 2006. FAOSTAT Agriculture Data. http://www.fao.org/statistics

Felsenstein J. 1988. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. Annu. Rev. Genet. 22:521-565.

Felsenstein J. 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distribuído por el autor. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle. (http:// evolution.genetics.washington. edu/phylip.html)

Fili J. 2002 El poroto como alimento. En: El cultivo de poroto en Argentina. Simone M y V Calvo (eds.) Ediciones INTA, Salta, Argentina. 308p.

Fofana B, Vekemans X, Du Jardin P y J Baudoin. 1997. Genetic Diversity in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by RAPD markers. Euphytica 95:157-161.

Frankel O, Burdon J y W Peacock. 1995. Landraces in transit – the treat perceived. Diversity 11: 14–15.

Freyre R, Ríos R, Guzmán L, Debouck D y P Gepts. 1996. Ecogeographic distribution of *Phaseolus* spp. (Fabaceae) in Bolivia. Econ. Bot. 50: 195-215.

Freyre R, Skroch P, Geffroy V, Adam-Blondon A, Shirmohamadali A, Johnson W, Llaca V, Nodari R, Pereira P, Tsai S, Tohme J, Dron M, Nienhuis J Vallejos C y P Gepts. 1998. Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. Theor. Appl. Genet. 97:847-856.

Galván M. 1999. Identificación de la variabilidad genética de variedades de poroto común, *Phaseolus vulgaris* L., mediante Fingerprint de ADN. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones.

Galván M, Aulicino M, García Medina S y P Balatti. 2001. Genetic diversity among northwestern argentinian cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as revealed by RAPD markers. Genet. Res. Crop Evol. 48:251-260.

Galván M, Bornet B, Balatti P y M Branchard. 2003. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and the gene pool of origin of common bean (*Phaseolus vulgaris* L). Euphytica 132: 297-301.

García Medina S, Faile V, De Simona M, Benaven J y M Salgado. 1993. Producción de poroto. 1er Curso Taller de Actualización sobre leguminosas secas. UBA-INTA. Octubre 1993, Bolsa de Cereales de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. 30p.

García Medina S. 1997. Mejoramiento genético en poroto. Simposio: Mejoramiento genético de cultivos de importancia en el NOA. XXVIII Congreso Argentino de Genética. 14-18 de setiembre de 1997, San Miguel de Tucumán, Argentina.

Gepts P y F Bliss. 1985. F_1 hybrid weakness in the common bean. J. Hered. 76:447-450.

Gepts P y F Bliss. 1986. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. Econ. Bot. 40:469-478.

Gepts P, Osborn T, Rashka K y F Bliss. 1986. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) evidence for multiple centers of domestication. Econ. Bot. 40: 451-468.

Gepts P y F Bliss. 1988. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. Econ. Bot. 42, 86-104.

Gepts P. 1990. Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabaceae) beans. Econ. Bot. 44:28-38.

Gepts P y D Debouck. 1991. Origin, Domestication and Evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). En: Common Beans: Research for Crop Improvement, van Schoonhover, A y O Voysest (eds.), CIAT-Centro Internacional de Agricultura Tropical. C.A.B.-Internacional. Wallingford, UK, pp 7-53.

Gepts P, Nodari R, Tsai S, Koinange E, Llaca V, Gilbertson R y P Guzman. 1993. Linkage mapping in common bean. Annu. Rep. Bean Improv. Coop. 36:24-38.

Gepts P. 1999. Development of an integrated linkage map. In: Developments in plant breeding. Common bean improvement in the twenty-first century. Singh S (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 53-91.

Gepts P y R Papa. 2002. Evolution during domestication. En: Encyclopedia of Life Sciences. London: Nature Publishing Group. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group, pp 1-7. (http://www.agronomy.ucdavis.edu/gepts/Gepts%20and%20Papa.%202002.pdf)

Gil J y A de Ron. 1991. Variation in *Phaseolus vulgaris* L. in the Northwest of the Iberian Peninsula. Plant Breed. 109: 313-319.

Gómez O, Blair M, Frankow-Lindberg B y U Gullberg. 2004. Molecular and phenotypic diversity of common bean landraces from Nicaragua. Crop Sci. 44:1412-1418.

González A, León J, Salinas A y P Gepts. 1998. Determination of genetic diversity among wild and domesticated beans using inter simple sequence repeats (ISSRs). Annu. Rep. Bean Improv. Coop. 41:99-100.

González A, Wong A, Salinas R y P Gepts. 2005. Assessment of inter simple sequence repeat markers to differentiate sympatric wild and domesticated populations of common bean. Crop Sci. 45: 606-615.

Gower J. 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. Biometrika 1966 53(3-4):325-338.

Grattapaglia D y M Ferreira. 1996. Introduçao ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2da edición. MA-EMBRAPA-CENARGEN. Brasília, DF. 220p.

Gupta M, Chyi Y, Romero-Severson J y J Owen. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. Theor. Appl. Genet. 80:998-1006.

Haley S, Miklas P, Afanador L y J 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.

Hamman A, Zink D y W Nagl. 1995. Microsatellite fingerprinting in the genus *Phaseolus*. Genome 38:507-515.

Hantula J, Dusabenyagasani M y R Hameln. 1996. Random amplified microsatellites (RAMS)- a novel method for characterizing genetic variation within fungi. Eur. J. For. Path. 26:159-166.

Harlan J. 1971. Agricultural origins:centers and non centers. Science 174:468–474

Harlan J. 1992. Crops & Man. 2nd edition. American Society of Agronomy, Inc.,Crop Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA. 283p.

Hoc P y M García. 1999. Biología floral y sistema reproductivo de *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* (Fabaceae). Rev. Biol. Trop. 47: 53-61.

Hoc P, Menéndez Sevillano M, Espert S, y A Burghardt, 2001. Variabilidad en poblaciones silvestres de *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae). XXVIII Jornadas Argentinas de Botánica. La Pampa, Argentina, p 46.

Hoc P, Espert S, Drewes S y A Burghardt. 2006. Hybridization between wild and domesticated types of *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae) in Argentina. Genet. Res. Crop Evol. 53:331-337.

Ibarra-Pérez F, Ehdaie B y J Giles Waines. 1997. Estimation of outcrossing rate in common bean. Crop Sci. 37:60-65.

Islam A, Beebe S, Muñoz M, Tohme J, Redden R y K Basford. 2004. Using molecular markers to assess the effect of introgression on quantitative attributes of common bean in the Andean gene pool. Theor. Appl. Genet. 108:243-252.

Johns T, Huamán Z, Ochoa C y P Schmiediche. 1987. Relationships among wild, weed, and cultivated potatoes in the *Solanum x anjuihuiri* complex. Syst. Bot. 12:541-552.

Johns M, Skroch P, Hinrichsen P, Bascur G y C Muñoz-Schick. 1997. Gene pool classification of common bean landraces from Chile, based on RAPD and morphological data. Crop Sci. 37:605-613.

Johnson W, Menéndez C, Nodari R, Koinange E, Magnusson S, Singh S y P Gepts. 1996. Association of a seed weight factor with the phaseolin seed storage protein locus across genotypes, environments, and genomes in *Phaseolus-Vigna* spp.: Sax (1923) revisited. J. Agric. Genomics 2 (antes J. Quant. Trait Loci): http://www.cabi-publishing.org/jag/papers96/paper596/indexp596.html

Johnson W, Guzmán P, Mandala D, Mkandawire A, Temple S, Gilberston R y P Gepts. 1997. Molecular tagging of the *bc-3* gene for introgression into Andean common bean. Crop Sci. 37:248-254.

Jung G, Coyne DP, Skroch P, Nienhuis J, Bokosi JM y J Steadman. 1996. RAPD marker linked to a gene for specific rust resistance in common bean. Annu. Rep. Bean Improv. Coop. 39:59-60.

Jung G, Skroch P, Coyne D, Nienhuis J, Arnaud-Santana E, Ariyarathna H, Kaeppler S y M Bassett. 1997. Molecular-markers-based genetic analysis of terapy bean-derived common bacterial blight resistance in different developmental stages of common bean. J. Am. Soc. Hort. Sci. 122:329-337.

Kami J, Becerra-Velásquez B, Debouck D y P Gepts. 1995. Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1101-1104.

Kami J y P Gepts. 2000. Development of a BAC library in common bean genotype BAT93. Annu. Rep. Bean Improv. Coop. 43:208-209.

Kaplan L, Lynch T y C Smith. 1973. Early cultivated beans (*Phaseolus vulgaris*) from an intermontane Peruvian valley. Science. 179:76-77.

Kelly J y P Miklas. 1996. The role of molecular markers in breeding for qualitative and quantitative traits of common bean. En: Taller para el mejoramiento del frijol para el siglo XXI. Bases para una estrategia para América Latina. Singh, S.P. y O. Voysest (eds.). 23 octubre-1º noviembre de 1996, CIAT, Cali, Colombia. 559p.

Kelly J y P Miklas. 1998. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. Mol. Breed. 4:1-11.

Kelly J, Gepts P, Miklas P y D Coyne. 2003. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. Field Crops Res. 82:135-154.

Khairallah M, Adams M y B Sears. 1990. Mitochondrial DNA polymorphism of Malawian bean lines: further evidence for two major gene pools. Theor. Appl. Genet. 80:753-761.

Khairallah M, Sears B y M Adams. 1992. Mitochondrial restriction fragment length polymorphism in wild *Phaseolus vulgaris* L.: insights on the domestication of the common bean. Theor. Appl. Genet. 84:915-922.

Koenig R y P Gepts. 1989. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of genetic diversity. Theor. Appl. Genet. 78:809-817.

Koenig R, Singh S y P Gepts. 1990. Novel phaseolin types in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). Econ. Bot. 44:50-60.

Koinange E, Shree S y P Gepts. 1996. Genetic control of the domestication syndrome in common bean. Crop Sci. 36:1037-1045.

Kolkman J y J Kelly. 2003. QTL conferring resistance and avoidance to white mold in common bean. Crop Sci. 43:539-548.

Laemmli I. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.

Lanteri A, Margaría C y M Cigliano. 2005. Análisis multivariado: Técnicas de agrupamientos. Árboles de distancias. En: Sistemática Biológica: fundamentos teóricos y ejercitaciones. Lanteri A y M Cigliano (eds.). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires, Argentina, pp. 93-106.

Legendre L y P Legendre. 1983. Ecologie numérique. Massón, Paris et les Presses de L' Université du Quebec, Canadá. Tome 2. 247p.

Maciel F, Gerald L y S Echeverrigaray. 2001. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers variability among cultivars and landraces of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) of south-Brazil. Euphytica 120:257-263.

Maciel F, Echeverrygaray S, Gerald L y F Grazziotin. 2003. Genetic relationships and diversity among Brazilian cultivars and landraces of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) revealed by AFLP markers. Genet. Res. Crop Evol. 50:887-893

Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27:209-220.

Mc Bride F. 1947. Cultural and historical geography of southwest Guatemala. Publication no. 4. Institute of Social Anthropology, Smithsonian Institution, Washington, DC, USA, 134-135.

McClean P, Myers J y J Hammond. 1993. Coefficient of parentage and cluster analysis of North dry bean cultivars. Crop Sci. 33:190-197.

McClean P, Lee R, Otto C, Gepts P y M Bassett. 2002. Molecular and Phenotypic Mapping of Genes Controlling Seed Coat Pattern and Color in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Hered. 2:93

Mc Nelly J. 1988. Economics and biological diversity: Developing and using incentives to conserve biological biodiversity. International Union for Conservation Natural Resources, Gland, Suiza.

Menéndez Sevillano M. 1985. Estudio y conservación de la variabilidad genética de *Phaseolus vulgaris* L. (poroto común) del noroeste argentino. Informe presentado en el Curso Internacional de Postgrado sobre Recursos Genéticos Vegetales. Argentina 14/X-8/X/-85.

Menéndez Sevillano M. 2002. Estudio y conservación del germoplasma silvestre y primitivo de *Phaseolus vulgaris* L. en el Noroeste de Argentina. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, España.

Métais I, Aubry C, Hamon B, Jalouzot R y D Peltier. 2000. Description and analysis of genetic diversity between commercial bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.). Theor. Appl. Genet. 1001:1207-1214.

Meyer W, Mitchell T, Freedman E y R Vilgays. 1993. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol. 31:2274-2280.

Miklas P, Johnson E, Stones V, Beaver J, Montoya C y M Zapata. 1996. Selective mapping of QTL conditioning disease resistance in common bean. Crop Sci. 36:1344-1351.

Miklas P, Smith J, Smith J, Riley R, Grafton K, Singh S, Jung G y D Coyne. 2000. Marker-assisted breeding for pyramided resistance to common bacterial blight in common bean. Annu. Rep. Bean Improv. Coop. 43: 39-40.

Miklas P, Johnson W, Delorme R y P Gepts. 2001. QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold in dry bean. Crop Sci. 41:309-315.

Miranda C. 1967. Origen de *Phaseolus vulgaris* L. (Frijol común). Agrociencia 1:99-109.

Mullis K y F Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Meth. Enzymol. 55:335-350.

Mumba L y N Galwey. 1998. Compatibility of crosses between gene pools and evolutionary classes in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Genet. Res. and Crop Evol. 45: 69-80.

Murphy R, Sites J, Buth D y C Haufler. 1996. Proteins: Isozyme electrophoresis. En: Molecular systematics, 2nd edition, Hillis D, Moritz C, Mable B (eds.), Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, pp 51-69.

Nienhuis J y S Singh. 1986. Combining ability analysis and relationships among yield, yield components and architectural traits in dry beans. Crop Sci. 26:21-27.

Nieva J, Vargar J, Tubello D, Volante J y D Fernández. 2002. Aspectos climáticos, edáficos y socioeconómicos. En: El cultivo de poroto en Argentina. Simone M y V Calvo (eds.) Ediciones INTA, Salta, Argentina. 308p.

Nodari O, Koinange E, Nelly J y P Gepts.1992. Towards an integrated linkage map of common bean. 1. Development of genomic DNA probes and levels of restriction fragment length polymorphism. Theor. Appl. Genet. 84:186-192.

Nodari R, Tsai S, Guzmán P, Gilberston R y P Gepts. 1993. Towards an integrated linkage map of common bean. III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. Genetics 134:341-350.

Olson M, L Hood, C Cantor y D Botstein. 1989. A common language for physical mapping of the human genome. Science 245: 1434-1435

Papa R y P Gepts. 2003. Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. Theor. Appl. Genet. 106:239-250.

Papa R y P Gepts. 2005. Gene flow between crops and their wild progenitors. Encyclopedia of Plant and Crop Sciences, pp 488-491. (http://www.agronomy.ucdavis.edu/gepts/Papa&Gepts%20EPCS%20Gene%20flow.2004.pdf)

Paran I y R Michelmore. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theor. Appl. Genet. 85:985-993.

Park S, Coyne D, Jung G, Skroch P, Arnaud-Santana E, Steadman J, Ariyarathne H y J Nienhuis. 2000. Mapping of QTL for seed size and shape traits in common bean. J. Am. Soc. Hort. Sci. 125:466-475.

Park S, Coyne D, Steadman J y P Skroch. 2001. Mapping of QTL for resistance to white mold disease in common bean. Crop Sci. 41:1253-1262.

Payró E, Gepta P, García Marin P y D Villareal. 2005. Spatial distribution of genetic diversity in wild populations of *Phaseolus vulgaris* L. from Guanajuato and Michoacán, México. 52:589-599.

Pearson W, Robins G y Z Tongtong. 1999. Generalized Neighbor-joining: More reliable phylogenetic tree reconstruction. Mol. Biol. Evol. 16:806-816.

Pickersgill B. 1971. Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (genus *Capsicum*). Evolution 25:683-691.

Posa-Macalincag M, Hosfield G, Grafton K, Uebersax M y J Kelly. 2002. Quantitative trait loci (QTL) analysis of canning quality traits in kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Am. Soc. Hort. Sci. 127:608-615.

Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafrey M, Vogel J, Tingey S y J Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol. Breed. 2:225-238.

Reeves T, Andersen P y R Pandya-Lorch. 1999. Food Security and the role of agricultural research. En: The genetics and exploitation of heterosis in crops, Coors y Pandey (eds.), American Society of Agronomy, Inc., Crop Science of America, Inc., Soil Science of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA, pp 1-5.

Raven P. 1987. The global ecosystem in crisis. Mc Arthur Foundation Occasional Papers, Chicago.

Rodiño A, Monteaguso A y M Santalla. 2001. Methodology for electrophoretic analysis of phasolin. En: Handbook on common bean related laboratory methods, Jacobsen H, Múzquiz M y A Hassa (eds.), PHASELIEU- FAIR-PL97-3463-Misión Biológica de Galicia (CSIC), España, pp 49-54.

Rohlf M. 1998. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.0. Department of Ecology and Evolution. State University of New York.

Rongwen J, Acalla M, Bhagwat A, Lavi U y P Cregan. 1995. The use of mocrosatellite DNA markers for soybean genotype identification. Theor Appl Genet 90:43-48.

Saiki R, Scharf S, Fallona F, Mullis K, Horn G, Erlich H y N Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of stickle cell anemia. Science. 230:1350-1354.

Saitou N y M Nei. 1987. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molec. Biol. Evol. 4:406-423.

Smartt J. 1988. Morphological, physiological, and biochemical changes in *Phaseolus* beans under domestication. En: Gepts P (ed.) Genetic resources of *Phaseolus* beans: their maintenance, domestication, evolution and utilization. Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp 143-161.

Sambrook J, Fritsch E y T Maniatis. 1989. Molecular Cloning. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.

Santalla M, Rodiño A y A De Ron. 2002. Allozyme evidence supporting southwestern Europe as a secondary center of genetic diversity for the common bean. Theor. Appl. Genet. 104:934-944.

Santalla M, Sevillano M, Monteagudo A y A de Ron. 2003. Genetic diversity of Argentinean common bean and its evolution during domestication. Euphytica 135:75-87.

Schneider S, Roessli D y L Excoffier. 2000. Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.

Schneider K, Grafton K y J Kelly. 2001. QTL analyses of resistance to Fusarium root rot in bean. Crop Sci. 41:535-542.

Schoonhover A y C Cardona. 1982. Low levels of resistance to the Mexican bean weevil in dry beans. J. Econ. Entomol. 75:567-569.

Serna R, Gallegos J, Durán R, Andrade H, Herrera P, Esquivel G y J Martínez. 2003. Genetic diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) bred germplasm in Mexico. Agric. Téc. Méx. 29:11-24.

Shand H. 1997. Human Nature: Agricultural Biodiversity and farm-based food security. RAFI-FAO, Canadá.

Singh S y J Gutiérrez. 1984. Geographical distribution of *DL1* and *DL2* genes causing hybrid dwarfism in *Phaseolus vulgaris* L., their association with seed size, and their significance to breeding. Euphytica 33:337-345.

Singh S, Debouck D y P Gepts. 1988. Razas de Frijol Común, *Phaseolus vulgaris* L. En: Temas actuales en mejoramiento genético del frijol común. Memorias del Taller Internacional de Mejoramiento Genético de Frijol, Beebe, S. (ed.), 7-12 Noviembre de 1988, CIAT, Cali, Colombia. 442p.

Singh S. 1991. Bean genetics. En: Common beans: Research for crop improvement, van Schoonhoven A y O Voysest (eds.), CAB International, Wallingford, pp 199-286.

Singh S, Gepts P y D Debouck D. 1991a. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). Econ. Bot. 45:379-396.

Singh S, Nodari R y P Gepts. 1991b. Genetic diversity in cultivated common bean: Allozymes. Crop Sci. 31:19-23.

Singh S. 1992. Common bean improvement in the tropics. Plant Breed. Rev. 10:199-269.

Singh S. 2001. Broadening the genetic base of common bean cultivars: a review. Crop Sci. 42:1659-1675.

Skroch P, Nienhuis J, Beebe S, Tohme J y F Pedraza. 1998. Comparison of Mexican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) core and reserve germplasm collections. Crop Sci. 38:488-496.

Smartt J.1988. Morphological, physiological and biochemical changes in *Phaseolus* beans under domestication. En: Genetic resources of Phaseolus Beans, P. Gepts (ed.), Kluwer, The Netherlands, pp 143-161.

Sneath P y R Sokal. 1973. Numerical Taxonomy. The principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman and Company. San Francisco, USA. 574p.

Sonnante G, Stockton T, Nodari R, Becerra Velásquez V y P Gepts. 1994. Evolution of genetic diversity during the domestication of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Theor. Appl. Genet. 89: 629-635.

Stenglein S, Arambarri A, Menéndez Sevillano M y P Balatti. 2005. Leaf epidermal characters related with plant's passive resistance to pathogens vary among accessions of wild beans *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* (Leguminosae-Phaseoleae). Flora 200: 285-295.

Stenglein S y P Balatti. 2006. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. Physiol. Molec. Plant Pathol. (Enviado).

Tar`an B, Michaels T y K Pauls. 2001. Mapping genetic factors affecting the reaction to *Xantomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* under field conditions. Genome 44:1046-1056.

Tarragó M. 1980. El proceso de agriculturización en el Noroeste Argentino, zona Valliserrana. En: Actas del Congreso Nacional Arqueología Argentina, Vol 1. Instituto de Investigaciones Arqueológicas y Museo, Universidad Nacional de San Juan, San Juan, Argentina, pp 181-217.

Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequence as a general sources for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res. 17:6463-6471.

Tohme J, Toro O, Vargas J y D Debouck. 1995. Variability in andean nuñas common beans (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) Econ. Bot. 49:78-95.

Tohme J, Gonzalez DO, Beebe S y M Duque. 1996. AFLP Analysis of gene pools of a wild bean core collection. Crop Sci. 36:1375-1384.

Triana B, Iwanaga M, Rubiano H y M Andrade. 1993. A study of allogamy in wild *Phaseolus vulgaris*. Annu. Rep. Bean Improv. Coop. 36: 20-21.

Tubello D y M Píccolo. 2002. Producción, comercialización y mercados. En: El cultivo de poroto en Argentina, Simone M y V Calvo (eds.), Ediciones INTA, Salta, Argentina. 308p.

Vallejos E, Sakiyama N y C Chase. 1992. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. Genetics 131:733-740.

Vanhouten W y S Mackenzie. 1999. Construction and characterization of a common bean bacterial artificial chromosome library. Plant Mol. Biol. 40:977-983.

Vavilov N. 1951. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. Translated by K. Start. Chron. Bot. 13: 1-366.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van De Lee T, Hornes M, Fritjers A, Pot J, Peleman J, Kuiper M y M Zabeau. 1995. AFLP: A new concept for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23:4407-4414.

Voysest O., Valencia M. y M. Amezquita. 1994. Genetic diversity among Latin American Andean and Mesoamerican common bean cultivars. Crop Sci. 34:1100-1110.

Voysest O. 2000. Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Legado de variedades de América Latina 1930-1999. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 195p.

Weising K, Winter B, Huttel B y G Kahl. 1998. Microsatellite markers for molecular breeding. J. Crop Prod. 1:113-143.

Wells W., Isom W. y J. Waines. 1988. Outcrossing rates of six common bean lines. Crop Sci. 28:117-178.

Welsh J y M McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18:7213-7218.

White J., J. Kornegay, J. Castillo, C. Molano, C. Cajiao y G. Tejada. 1992. Effect of growth habit on yield of large-seeded bush cultivars of common bean. Field Crops Res. 29:151-161.

Wilkes H. 1977. Hybridization of maize and teosinte, in Mexico and Guatemala and the improvement of maiza. Econ. Bot. 31:254-293.

Williams J, Kubelik A, Livak K, Rafalski L y S Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:7213-7218.

Wilson E. 1988. The current state of biological diversity. En: Biodiversity, Wilson, E. (ed.), National Academy Press, Oxford, pp 3-18.

Wilson E. 1992. La diversidad de la vida. Crítica, Barcelona.

Wittmack L.1980. (Untitled) Sitzungsber. Bot.Ver.Prov. Brandenburg 21: 176-184.

Wu K, Jones R, Dannaeberger L y P Scolnik. 1994. Detection of minisatellite polymorphisms without cloning. Nucleic Acids Res. 22:3257-3258.

Yeboah F, Alli I, Simpson B, Konishi Y y B Gibbs. 1999.Tryptic fragments of phaseolin from protein isolates of Phaseolus beans. Food Chemistry 67:105-112.

Yu K, Park SJ y P Poysa. 1999. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). Genome 42:27-34.

Yu K, Park SJ y V Poysa. 2000. Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficacy and economics. Plant Breed. 119:411-415.

Yu Z, Stall R y C Vallejos. 1998. Detection of genes for resistance to common bacterial blight of beans. Crop Sci. 38:1290-1296.

Zietkiewicz E, Rafalski A y D Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20:176-183.

Zizumbo-Villarreal D, Colunga P, Payró E, Delgado P y P Gepts. 2005. Population structure and evolutionary dynamics of wild-weedy-domesticated complexes of common bean in a mesoamerican region. Crop Sci. 45: 1073-1083.