

# Caracterización molecular de germoplasma de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) con marcadores RAPD

## Molecular characterization of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) germoplasm using RAPD markers

A. Russo<sup>1</sup>, E. Salazar<sup>1</sup>, A. Higuera<sup>2</sup>, L. Castro<sup>1</sup> y S. Vásquez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Biotecnología Vegetal. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP). Zona Universitaria vía El Limón. Edificio 09. Maracay, 2101, Venezuela.

<sup>2</sup>Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Avenida 16 (Guajira). Ciudad Universitaria "Dr. Antonio Borjas Romero". Núcleo Agropecuario. Maracaibo, 4005, Venezuela.

### Resumen

El frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) es una leguminosa con importancia social y económica en Venezuela. La Universidad del Zulia mantiene una colección de 33 genotipos de frijol, la cual está descrita de manera tradicional. El objetivo del estudio fue la caracterización molecular con marcadores RAPD de los 33 genotipos de la referida colección más seis genotipos de *Vigna* provenientes de la colección de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Para ello se utilizó tejido foliar, teniéndose como hipótesis que cada genotipo tendría un patrón de bandas característico. Una vez aislados, los ADNs se amplificaron con 21 cebadores para ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD por sus siglas en inglés). La estrategia de aislamiento de ADN fue efectiva, ya que permitió obtener ADN puro y en concentraciones suficientes para realizar las pruebas moleculares. Con los marcadores RAPD se obtuvieron patrones de bandas característicos para cada genotipo estableciéndose diferencias entre ellos. El 43% de los cebadores de la serie OPE lograron amplificar fragmentos en los 39 genotipos. En promedio se obtuvieron 18 bandas por secuencia empleada, lo que evidenció un nivel medio de polimorfismo. El contenido de información polimórfica por cebador fue notablemente bajo, posiblemente porque algunas bandas estuvieron presentes en pocos individuos. Sin embargo, las bandas permitieron identificar genéticamente los genotipos. El análisis de conglomerado dividió los genotipos en dos grandes grupos y cuatro subgrupos, por procedencia geográfica y algunos por color de semilla. Los índices de diversidad genética de Shannon (H) y de Margaleff (L) establecieron que la diversidad entre los genotipos fue baja.

**Palabras clave:** *Vigna*, banco de germoplasma, diversidad genética, marcadores moleculares, ácido desoxirribonucleico.

Recibido el 17-02-2015 • Aceptado el 23-10-2015

Autor de correspondencia e-mail: rusoantonio82@gmail.com

## Abstract

Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) is a legume crop with social and economic importance in Venezuela. A germplasm collection of 33 genotypes collected by Universidad del Zulia is maintained and it has been characterized with traditional descriptors. The goal of this study was to have the molecular characterization of the above mentioned collection plus six *Vigna* genotypes from the National Institute of Agriculture Research (INIA) Germplasm collection. Foliar tissue was used for the objective and the main hypothesis was that each genotype will have its own band pattern. Isolated DNAs were amplified with 21 random primers. An effective DNA isolation strategy was obtained and it yielded pure molecules of suitable concentration for further molecular analysis. RAPD markers allowed to obtain band patterns specific for each material and were able to establish differences among them. Forty-three percent of the primers were able to amplify fragments in the 39 materials, producing an average of 18 bands per genotype. A low PIC value was obtained for each primer probably due to the fact that many bands were present in very few individuals. In spite of this, bands allowed the genetic identification of the materials. The conglomerate analysis divided the samples in two groups and four subgroups. Materials were separated by geographic provenance and color of the seed. Genetic diversity was estimated low, through the use of genetic diversity indexes.

**Key words:** *Vigna*, germplasm bank, genetic diversity, molecular markers, deoxiribonucleic acid.

## Introducción

El frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) es una leguminosa de grano cuyo centro de origen es África Occidental, donde se han identificado 120 especies de las cuales 66 son endémicas (Faris, 1965; Padulosi y Ng, 1997; Simon *et al.*, 2007). El frijol es una especie cultivada desde épocas remotas con fines alimenticios. Actualmente se cultiva, principalmente, en África donde las hojas verdes son importantes para el consumo humano. Las vainas inmaduras también se consumen y se mezclan con otros alimentos. El frijol es considerado un alimento excelente por su contenido alto de proteínas, carbohidratos y vitaminas A y C.

## Introduction

Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) is a legume with an origin from Occidental Africa where 120 species have been identified out of which 66 are endemic (Faris, 1965; Padulosi and Ng, 1997; Simon *et al.*, 2007). Cowpea was initially cropped with food purpose. Currently, it is mainly cropped in Africa where the green leaves are important for the human consumption. The unripe sheaths are also consumed and are mixed with other food. Cowpea is considered as an excellent food due to its high protein content, carbohydrates and vitamins A and C. Nowadays, it is mainly sowed in the African Occidental Tropic where 70% of the crop

En la actualidad se siembra principalmente en el trópico occidental africano, de donde 70% de la producción del cultivo proviene de la zona subsahariana (FAO, 2011) y en varios países latinoamericanos, destacándose la producción de Brasil. En Venezuela, el frijol es la segunda leguminosa de grano en importancia, con una producción total de 6.955 Tm en el 2014, en una superficie cosechada de 8.517 ha, con un rendimiento promedio de 817 kg.ha<sup>-1</sup> (Fedeaagro, 2011).

En Venezuela, el frijol es una leguminosa de grano que se ha caracterizado por ser un cultivo de subsistencia para la población campesina, siendo consumida por sus altos contenidos de proteína (Piccirillo e Higuera, 1997; Gupta *et al.*, 2010). Así de esta manera, muchos genotipos a nivel local se han conservado de generación en generación hasta convertirse en un valioso recurso genético, dado su valor social y por ser fuente de variabilidad genética, útil en programas de mejoramiento genético (Gutiérrez *et al.*, 2004). Aunado a lo anterior y como consecuencia de la crisis económica que vive el país, la demanda de este cultivo se ha visto incrementada por ser una fuente accesible para los estratos sociales de menores ingresos y por ello es necesario incrementar su producción.

En el caso de los genotipos mantenidos localmente por los agricultores resulta necesario conservar esa diversidad genética, de manera de contribuir con la preservación de las posibles razas locales y servir de reservorio para garantizar a las comunidades la disponibilidad de las semillas que tradicionalmente cultivan. Dada la impor-

production comes from the Saharian area (FAO, 2011) and in different Latin American countries, highlighting the production of Brazil. In Venezuela, cowpea is the second grain legume of importance with a total production of 6,955 Tm in 2014, in a cropped surface of 8,517 ha, with an average yield of 817 kg.ha<sup>-1</sup> (Fedeaagro, 2011).

In Venezuela, cowpea is a grain legume characterized by being a subsistence crop for the peasant population, being eaten by its high protein contents (Piccirillo and Higuera, 1997; Gupta *et al.*, 2010). Likewise, many genotypes locally have preserved from generation to generation until becoming into a valuable genetic resource due to its social value and by being a source of genetic variability, useful in programs of genetic improvement (Gutiérrez *et al.*, 2004). Due to the latter and as a consequence of the economic crisis of Venezuela, the demand of this crop has increased by being an accessible source for the society with lowest income, this is the reason the production must increase.

In the case of the genotypes kept locally by the agricultures it turns out necessary to preserve the genetic diversity to contribute to the preservation of the possible local strain and work as reservoir to guarantee the communities the availability of the seed that traditionally crop. Due to the importance of the legume as a food source, the germplasm is being preserved *in situ* conditions (Gebauer *et al.*, 2007), and *ex situ* (Gutiérrez *et al.*, 2004; González *et al.*, 2006; Balarezo *et al.*, 2009).

The collection of legumes has been traditionally characterized

tancia de las leguminosas como fuente de alimentos, el germoplasma está siendo conservado tanto en condiciones *in situ* (Gebauer *et al.*, 2007), como *ex situ* (Gutiérrez *et al.*, 2004; González *et al.*, 2006; Balarezo *et al.*, 2009).

Las colecciones de leguminosas han sido caracterizadas tradicionalmente mediante estudios morfológicos (Madriz y Luciani, 2002; Hoc *et al.*, 2006), anatómicas (García y Madriz, 1999; Mbagwu y Edeoga, 2006), fisiológicas (Arámbulo *et al.*, 2007; Ávila-Serrano *et al.*, 2010) y bioquímicas (Panella y Gepts, 1992; Blair *et al.*, 2007). De igual modo, los patrones de ADN polimórfico amplificados al azar (RAPD) han sido útiles para estudiar la estabilidad genética de genotipos de *Vigna* propagados *in vitro* (Shivakumar *et al.*, 2011). Los marcadores RAPD también han resultado útiles para la detección de polimorfismos en germoplasma de *Vigna* y la detección de una alta variabilidad genética entre los individuos estudiados (Patil *et al.*, 2013). De igual modo, Alam *et al.* (2013) mediante el uso de marcadores RAPD establecieron semejanzas genéticas entre cinco cultivares de *V. unguiculata*, resaltando la utilidad de este tipo de marcadores en establecer diferencias entre los genotipos y la aparición de bandas únicas para cada genotipo analizado.

Los marcadores RAPD también se han utilizado para el estudio de diversidad genética y caracterización molecular de germoplasma de *V. radiata* (L.) Wilczek (Sony *et al.*, 2012, Roopa y Ranade, 2013), *V. mungo* (Singh y Kar, 2013) entre otras especies de leguminosas. Por lo anterior, se resalta el valor de los marcadores

through morphologic studies (Madriz and Luciani, 2002; Hoc *et al.*, 2006), anatomic (García and Madriz, 1999; Mbagwu and Edeoga, 2006), physiologic (Arámbulo *et al.*, 2007; Ávila-Serrano *et al.*, 2010) and biochemical (Panella and Gepts, 1992; Blair *et al.*, 2007). Likewise, the randomized amplified polymorphic DNA patterns (RAPD) have been useful to study the genetic stability of *Vigna* genotypes propagated *in vitro* (Shivakumar *et al.*, 2011). RAPD markers have also been useful for detecting the polymorphisms in germplasm of *Vigna* and the detection of a high genetic variability among the individuals studied (Patil *et al.*, 2013). Likewise, Alam *et al.* (2013) using the RAPD markers established genetic similarities among five cultivars studied of *V. unguiculata*, mentioning the usefulness of this type of marker in establishing differences among the genotypes and the apparition of unique bands for each genotype analyzed.

RAPD markers have also been used for the study of genetic diversity and molecular characterization of germplasm of *V. radiata* (L.) Wilczek (Sony *et al.*, 2012, Roopa and Ranade, 2013), *V. mungo* (Singh and Kar, 2013) among other legume species. Because of the latter, the value of the RAPD is stressed as useful tools for the study of the genetic diversity and the molecular characterization in germplasm of *Vigna*; consequently, for the preservation programs of germplasm and the genetic improvement in cowpea.

In this sense, currently in the Germplasm Bank of the National Center of Agriculture Research (INIA-

RAPD como herramientas útiles para el estudio de diversidad genética y caracterización molecular en germoplasma de *Vigna*, y en consecuencia para los programas de conservación de germoplasma y de mejoramiento genético en frijol.

En este sentido, actualmente en el Banco de Germoplasma del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP), se mantiene una colección de genotipos de esta leguminosa, el cual incluye una selección de variedades recolectadas en todo el país y que son conservadas a mediano y largo plazo con el propósito de garantizar la preservación, principalmente de la semilla. Más específicamente, se tienen 33 genotipos de frijol recolectados en el estado Zulia, los cuales se han caracterizado con los descriptores tradicionales. Sin embargo, se hace necesaria una caracterización genética más precisa, a fin de poder tener la identidad de cada uno de los genotipos conservados. En tal sentido, el objetivo del trabajo fue caracterizar molecularmente dichos genotipos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. y el estudio de la variabilidad genética presente entre ellos utilizando cebadores RAPD.

## Materiales y métodos

El estudio se realizó en la Unidad de Biotecnología del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP), ubicada en el Campo Experimental CENIAP, en Maracay, Venezuela. Se utilizó tejido foliar de 33 genotipos de frijol (*V. unguiculata*) recolectados por la Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia y seis

CENIAP), a collection of genotypes of this legume is kept which includes a selection of varieties collected in all the country and are preserved in medium and long term with the aim of guaranteeing the preservation of the seed. More specifically, there are 33 genotypes of cowpea collected in Zulia state which have characterized with the traditional descriptors. However, it is necessary a more accurate genetic characterization with the purpose of identifying each of the preserve genotypes. In this sense, the aim of this research was to characterize molecularly such genotypes of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and the study of genetic variability present among them, using RAPD primers.

## Materials and methods

The research was carried out at the Biotechnology Unit of the National Center of Agriculture Research (INIA-CENIAP), located in the experimental field CENIAP, Maracay, Venezuela. A foliar tissue of 33 genotypes of cowpea (*V. unguiculata*) was used, collected by the Agronomy Faculty, Universidad del Zulia, and six genotypes considered witnesses of *Vigna* from the Germplasm collection of INIA-CENIAP (table 1).

The isolation of the DNA was performed according to the methodology of Dellaporta *et al.* (1983), modified by CIAT (1999) with 0.2 g of foliar tissue without the central nerve. The concentration and purity of DNA were analyzed electrophotometrically using the Nanodrop 1000 Thermo, in which was directly obtained the DNA concentration in  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , and the A260/

genotipos, considerados testigos de *Vigna* de la colección de Germoplasma del INIA-CENIAP (cuadro 1).

El aislamiento del ADN se realizó según la metodología de Dellaporta *et al.* (1983), modificada por CIAT (1999) con 0,2 g de tejido foliar sin nervadura central. La concentración y pureza del ADN se analizaron electrofotométricamente utilizando el Nanodrop 1000 de Thermo, en el cual se obtuvo directamente la concentración del ADN en  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , y las relaciones A260/A280 y A260/A230, quienes indicaron la pureza de la molécula aislada. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante un análisis de varianza (ANAVAR) previo análisis de normalidad de los resultados de acuerdo a la prueba Shapiro-Wilks (1965), y la prueba de homocedasticidad de Levene (1960). El experimento siguió un diseño completamente aleatorizado.

Las reacciones RAPD se realizaron en tubos de 0,2 mL de paredes ultradelgadas, conteniendo 10-20 ng de ADN genómico, 0,2 unidades de GoTaq Polimerasa Flexi (Promega), 0,8  $\mu\text{M}$  del iniciador, 3,0  $\mu\text{l}$  de buffer de reacción (5X),  $\text{MgCl}_2$  (1,33 mM), BSA (0,2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), dNTPs (0,11 mM de cada nucleótido) en un volumen final de 15  $\mu\text{l}$ . Se utilizaron 20 secuencias de iniciadores RAPD de la serie OPE (Operon technologies) y un cebador OPA (OPA-07). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador modelo PT-200 marca MJ Research, con un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguido de 45 ciclos con 93°C por 30 segundos, 36°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Las

A280 and A260/A230 relations that indicated the pureness of the isolated molecule. The statistical analysis of the results was carried out using the variance analysis (ANAVAR) prior to the normality analysis of the results according to the Shapiro-Wilks test (1965), and the homoscedasticity of Levene (1960). The experiment had a completely randomized design.

The RAPD reactions were carried out in tubes of 0.2 mL of ultra-thin walls, containing 10-20 ng of genome DNA, 0.2 units of Flexi polymerase GoTaq (Promega), 0.8  $\mu\text{M}$  of the initiator, 3.0  $\mu\text{l}$  of the reaction buffer (5X),  $\text{MgCl}_2$  (1.33 mM), BSA (0.2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), dNTPs (0.11 mM of each nucleotide) in a final volume of 15  $\mu\text{l}$ . Twenty sequences of RAPD initiators of the OPE series were used (Operon technologies) and an OPA primer (OPA-07). The amplifications were done in a thermal cycler model PT-200 brand MJ Research, with an initial denaturing phase at 94°C for 5 minutes, followed by 45 cycles with 93°C for 30 seconds, 36°C for 30 seconds, 72°C for 2 minutes and a final extension at 72°C for 10 minutes. The reactions kept at 4°C until their analysis.

The division of the amplification products was done in agarose gels 1.5% for 90 minutes at 90 V  $\pm$  70 mA, with buffer TBE 0.5X as electrode buffer. The amplification products were visualized prior to a staining with an ethidium bromide solution 0.5  $\mu\text{M}$ , in an image digitizer model Chemi-Doc of Biorad, using the Software Quantity One version 4.2. For each initiator the percentage of polymorphic bands was calculated (%BP) and the polymorphic

**Cuadro 1. Lista de genotipos de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. utilizadas en el presente estudio.**  
**Table 1. List of cowpea genotypes (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. used in the current research.**

Material	Código	Especie	Color de la semilla	Procedencia
1	Vu-LUZ-0001	<i>Vigna unguiculata</i>	Ojo Negro	Municipio Mara (Zulia)
2	Vu-LUZ-0002	<i>V. unguiculata</i>	Ojo Negro	Mutante de LUZ
3	Vu-LUZ-0003	<i>V. unguiculata</i>	Ojo Negro	Mutante de LUZ
4	Vu-LUZ-0004	<i>V. unguiculata</i>	Ojo Negro	Mutante de LUZ
5	Vu-LUZ-0005	<i>V. unguiculata</i>	Ojo Negro	Mutante de LUZ
6	Vu-LUZ-0006	<i>V. unguiculata</i>	Ojo Negro	Genotipo en S <sub>5</sub> LUZ
7	Vu-LUZ-0007	<i>V. unguiculata</i>	Ojo Negro	Genotipo en S <sub>5</sub> LUZ
8	Vu-LUZ-0008	<i>V. unguiculata</i>	Ojo Negro	Genotipo en S <sub>5</sub> LUZ
9	Vu-LUZ-0009	<i>V. unguiculata</i>	Ojo Negro	Genotipo en S <sub>5</sub> LUZ
10	Vu-LUZ-0010	<i>V. unguiculata</i>	Ojo Negro	Genotipo en S <sub>5</sub> LUZ
11	Vu-LUZ-0011	<i>V. unguiculata</i>	Ojo Negro	Genotipo en S <sub>5</sub> LUZ
12	Vu-LUZ-0014	<i>V. unguiculata</i>	Ojo Negro	Genotipo en S <sub>5</sub> LUZ
13	Vu-LUZ-0016	<i>V. unguiculata</i>	Ojo Negro	Genotipo en S <sub>5</sub> LUZ
14	Vu-LUZ-0017	<i>V. unguiculata</i>	Ojo Negro	Genotipo en S <sub>5</sub> LUZ
15	Vu-LUZ-0018	<i>V. unguiculata</i>	Ojo Negro	Genotipo en S <sub>5</sub> LUZ
16	Vu-LUZ-0019	<i>V. unguiculata</i>	Ojo Negro	Genotipo en S <sub>5</sub> LUZ
17	Vu-LUZ-0022	<i>V. unguiculata</i>	Ojo Negro	Mutante ON-30(6) ?
18	Vu-LUZ-0023	<i>V. unguiculata</i>	Negro	San Joaquin (Zulia)
19	Vu-LUZ-0024	<i>V. unguiculata</i>	Negro	San Joaquin (Zulia)
20	Vu-LUZ-0026	<i>V. unguiculata</i>	Negro	San Joaquin (Zulia)
21	Vu-LUZ-0028	<i>V. unguiculata</i>	Bayo	Costa Oriental del Lago (Zulia)
22	Vu-INI-0003	<i>V. unguiculata</i>	Bayo c/pintas	MunicipioGuajira (Zulia)
23	Vu-INI-0006	<i>V. unguiculata</i>	Marrón c/pintas	MunicipioGuajira (Zulia)
			Selección baya	MunicipioGuajira (Zulia)
			Marrón claro	MunicipioGuajira (Zulia)
			Marrón oscuro	MunicipioGuajira (Zulia)
			Crema	INIA-CENIAP
			Crema	INIA-CENIAP

Cuadro 1. Lista de genotipos de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. utilizadas en el presente estudio (continuación).Table 1. List of cowpea genotypes (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. used in the current research (continuation).

Material	Código	Especie	Color de la semilla	Procedencia
24	Vu-INI-0008	<i>V. unguiculata</i>	Crema	INIA-CENIAP
25	Vu-INI-0011	<i>V. unguiculata</i>	Crema	INIA-CENIAP
26	Vu-UFL-0001	<i>V. unguiculata</i>	Ojo Negro	Universidad de Florida
27	Vu-UFL-0002	<i>V. unguiculata</i>	Crema	Universidad de Florida
28	Vu-UFL-0003	<i>V. unguiculata</i>	Crema	Universidad de Florida
29	Vu-UFL-0004	<i>V. unguiculata</i>	Crema	Universidad de Florida
30	Vu-UFL-0005	<i>V. unguiculata</i>	Crema	Universidad de Florida
31	Vu-UFL-0006	<i>V. unguiculata</i>	Bayo	Universidad de Florida
32	Vu-COL-0001	<i>V. unguiculata</i>	Ojo Negro	Mercado Barranquilla
33	Vu-PER-0001	<i>V. unguiculata</i>	Ojo Negro	Mercado Lima, Perú
I-475	MGM-01-98-024	<i>V. umbellata</i>	crema	Carabobo
I-480	DP-02-98-04	<i>V. unguiculata</i>	Amarillo	Carabobo
I-542	MGM-06-01-08	<i>V. radiata</i>	Verde	Zulia
I-570	MG-07-02-001	<i>V. unguiculata</i>	crema	Falcón
I-630	DON-14-06-010	<i>V. sp.</i>	Rojiza	Carabobo
I-677	DP-10-09-004	<i>V. umbellata</i>	crema	Aragua



reacciones se mantuvieron a 4°C hasta el momento del análisis.

La separación de los productos de amplificación se realizó en geles de agarosa 1,5% durante 90 minutos a 90 V ± 70 mA, con buffer TBE 0,5X como buffer de electrodo. Los productos de amplificación se visualizaron, previa tinción con una solución de bromuro de etidio 0,5 µM, en un digitalizador de imágenes modelo Chemi-Doc de Biorad, mediante el Software Quantity One Versión 4.2. Para cada iniciador se calculó el porcentaje de bandas polimórficas (%BP) y el contenido de información polimórfica (PIC) según la metodología de Roldán-Ruiz *et al.* (2000). Se obtuvieron los patrones de bandas característicos para cada genotipo estudiado y se realizó un análisis descriptivo de los patrones.

Adicionalmente, se hizo un análisis de conglomerado jerárquico, utilizando el programa Past versión 2.03. Los análisis se realizaron utilizando el método de agrupamiento de grupos pareados y la distancia de Jaccard. El análisis utilizó los datos transformados con la expresión X-(media/desviación standard). Para el análisis de la diversidad genética se calcularon los índices de Shannon (H) (Shannon y Weaver, 1949) y el de Margaleff (1958) mediante el mismo programa estadístico.

## Resultados y discusión

La concentración de ADN y pureza de las 39 muestras de frijoles tuvieron una distribución normal, con un índice Shapiro-Wilk (W) de 0,96 (cuadro 2). La prueba de Levene para la homogeneidad de las varianzas indicó

information content (PIC) according to the methodology of Roldán-Ruiz *et al.* (2000). The band patterns typical of each genotype studied were studied and a descriptive analysis of the patterns was performed.

Additionally, a hierarchical conglomerate analysis was done using the Past program, version 2.03. The analyses were performed using the grouping method of paired groups and the Jaccard distance. The analysis used the data transformed with the X expression-(medium/standard deviation). For the analysis of the genetic diversity, Shannon indexes were calculated (H) (Shannon and Weaver, 1949) and Margaleff (1958) using the same statistical program.

## Results and discussion

The DNA concentration and pureness of the 39 cowpea samples had a normal distribution with a Shapiro-Wilk index (W) of 0.96 (table 2). Levene test for the variance homogeneity indicated equality among the variances of the three sets evaluated. The significant differences between the concentration and pureness values of the DNA revealed that the efficiency of the extraction process was linked to the genotype.

However, the overlapping of the statistical differences compared to the means suggested that the main differences were on the genotypes with the highest and lowest concentration values of the isolated DNA. On the other hand, the quantities of the DNA isolated with the protocol used resulted significant higher (76 to 3900 µg.g<sup>-1</sup>) to the yields reported for the species of

**Cuadro 2. Concentración en ng.µl<sup>-1</sup> y pureza del ADN aislado a partir de tejido foliar de 39 individuos de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.).****Table 2. Concentration in ng.µl<sup>-1</sup> and pureness of the isolated DNA after the foliar tissue of 39 individuals of cowpea (*Vigna unguiculata*(L.) Walp.).**

Muestra de <i>Vigna</i>	Concentración en ng.µl <sup>-1</sup>	A260/280
1	3888 ± 151 <sup>a</sup>	1,92
2	2311 ± 170 <sup>bcdefg</sup>	1,91
3	2526 ± 425 <sup>abcdef</sup>	1,51
4	3659 ± 547 <sup>abc</sup>	1,9
5	2247 ± 78 <sup>bcdefg</sup>	1,98
6	1044 ± 502 <sup>ghijkl</sup>	1,95
7	78 ± 44 <sup>k</sup>	1,05
8	2819 ± 161 <sup>abcde</sup>	1,72
9	1632 ± 9 <sup>defghijk</sup>	1,99
10	1924 ± 394 <sup>defgh</sup>	1,92
11	76 ± 21 <sup>k</sup>	1,22
12	821 ± 697 <sup>ghijk</sup>	1,6
13	1972 ± 75 <sup>defg</sup>	1,95
14	3174 ± 54 <sup>abcd</sup>	1,5
15	1308 ± 119 <sup>efghijk</sup>	1,92
16	2255 ± 144 <sup>bcdefg</sup>	1,94
17	894 ± 794 <sup>ghijk</sup>	1,63
18	2343 ± 425 <sup>abcdefg</sup>	1,94
19	1024 ± 673 <sup>ghijk</sup>	1,83
20	1092 ± 669 <sup>ghijk</sup>	1,83
21	1198 ± 47 <sup>ghijk</sup>	1,8
22	3128 ± 1034 <sup>abcd</sup>	1,89
23	1674 ± 328 <sup>defghij</sup>	1,9
24	253 ± 26 <sup>jk</sup>	1,76
25	1566 ± 74 <sup>efghij</sup>	1,94
26	845 ± 647 <sup>ghijk</sup>	1,91
27	3682 ± 527 <sup>abc</sup>	1,9
28	2139 ± 110 <sup>cdefg</sup>	1,91
29	1234 ± 818 <sup>ghijk</sup>	1,8
30	877 ± 648 <sup>ghijk</sup>	1,92
31	383 ± 34 <sup>hijk</sup>	1,91
32	1857 ± 605 <sup>defghi</sup>	1,81

\*Valores similares en letras para cada promedio indica que no hay diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la Prueba de Tukey a un nivel de significancia del 0,05.

**Cuadro 2. Concentración en  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  y pureza del ADN aislado a partir de tejido foliar de 39 individuos de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (continuación).**

**Table 2. Concentration in  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  and pureness of the isolated DNA after the foliar tissue of 39 individuals of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (continuation).**

Muestra de <i>Vigna</i>	Concentración en $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	A260/280
33	$2190 \pm 162^{\text{bcdefg}}$	1,78
I-475	$335 \pm 70^{\text{ijk}}$	1,65
I-480	$1065 \pm 600^{\text{fghijk}}$	1,58
I-542	$390 \pm 21^{\text{hijk}}$	1,61
I-570	$3710 \pm 861^{\text{ab}}$	1,48
I-630	$3662 \pm 970^{\text{abc}}$	1,57
I-677	$254 \pm 21^{\text{jk}}$	1,71

\*Valores similares en letras para cada promedio indica que no hay diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la Prueba de Tukey a un nivel de significancia del 0,05.

igualdad entre las varianzas de los tres sets evaluados. Las diferencias significativas entre los valores de concentración y pureza del ADN, reveló que la eficiencia del proceso de extracción estuvo estrechamente ligada con el genotipo.

Sin embargo, el solapamiento de las diferencias estadísticas en la comparación de medias, sugirió que las principales diferencias se encontraron entre los genotipos con los mayores y menores valores de concentración de ADN aislado. Por otro lado, las cantidades de ADN aislado con el protocolo utilizado resultó sustancialmente superior ( $76$  a  $3900 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) a los rendimientos reportados para especies del género *Vigna*, donde los valores oscilaron entre  $18$  y  $56 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de hoja (Choudhary *et al.*, 2008). Del mismo modo, los altos valores de rendimiento obtenidos en el presente trabajo superaron el rendimiento en ADN obteni-

the genre *Vigna*, where the values oscillated from  $18$  to  $56 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  of the leaf (Choudhary *et al.*, 2008). Likewise, the high values of the yield obtained in the current research exceeded the yield in DAN obtained when using commercial Kits (Keb-Llanes *et al.*, 2002; Horne *et al.*, 2004).

In relation to the pureness of the isolated molecules, the obtained values indicated that the DNA was pure. The expected value should have been from  $1.8$  to  $2.0$  (Warburg and Christian, 1942), which occurred in approximately 70% of the cases. The rest of the genotypes presented relation indexes A260/A280 inferior to the value desired; thus, indicating the presence of proteins in the samples. In any case, the presence of proteins in the samples did not limit their amplification, reason for which the use of the protease was unnecessary for a better purification of the isolated DNA.

do al utilizar Kits comerciales (Keb-Llanes *et al.*, 2002; Horne *et al.*, 2004).

Con relación a la pureza de las moléculas aisladas, los valores obtenidos indicaron que se estaban aislando ADN puros. El valor esperado debió oscilar entre 1,8 y 2,0 (Warburg y Christian, 1942), lo cual ocurrió en aproximadamente 70% de los casos. El resto de los genotipos presentaron unos índices de relación A260/A280 inferiores al valor deseado, indicando la presencia de proteínas en las muestras. En cualquiera de los casos la presencia de proteínas en las muestras no impidió la amplificación de las mismas, razón por la cual no se consideró necesario el uso de proteinasa para una mayor purificación de los ADN aislados.

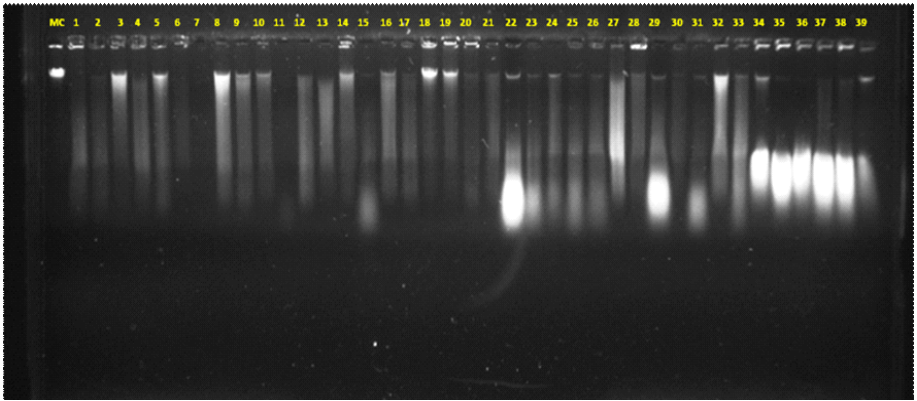
El análisis de calidad demostró la integridad de la molécula de ADN al observarse como bandas discretas bien definidas (figura 1). Las zonas brillantes que se observaron en la sección media y baja del gel correspondieron a fracciones de ARN, las cuales no interfirieron en el proceso de amplificación de las muestras. Las moléculas de ADN se precipitaron como un sedimento blanquecino, lo que indicó la ausencia de procesos de oxidación en la molécula. Con la presente metodología se logró el aislamiento de un ADN intacto y de calidad sin la necesidad de utilizar protocolos que involucraran el uso de sustancias orgánicas de alto riesgo como el cloroformo o el fenol, haciendo de la presente metodología una estrategia más segura.

Resultados similares se obtuvieron para el aislamiento de ADN a partir de tejido foliar, donde se obtuvo un ADN de elevada pureza, aun cuando los rendimientos fueron menores que

The quality analysis showed the integrity of the DNA molecule when observed as well defined discrete bands (figure 1). The bright areas observed in the medium section and low sections of the gel corresponded to the ARN fractions, which did not interfere with the amplification process of the samples. The DNA molecules precipitated with whitish sediment, which indicated the absence of the oxidation processes in the molecule. With the current methodology the isolation of an intact and quality DNA was obtained without the need of using protocols that would involve the use of risky organic substances such as chloroform or phenol; thus, this methodology became into a safer strategy.

Similar results were obtained for the isolation of the DNA after the foliar tissue where a DNA of high pureness was obtained, even when the yields were lower than in the current study (Niu *et al.*, 2008). Sharma *et al.* (2011) reported an effective methodology for the isolation of DNA with quality in *Vigna* species without the use of toxic and low cost reactive. However, the yields were under the reported in the current study. The isolated DNA was adequate for the amplification tests and allowed obtaining specific band patterns when being amplified with the randomized anchoring oligonucleotides used in the current study.

RAPD allowed the formation of band patterns in all *Vigna* genotypes studied with four of the studied primers (figure 2). RAPD markers were effective to establish the differences among the studied accessions. Similarly, Muthusamy *et al.* (2008) determined that the RAPD



**Figura 1.** ADN de 30 muestras de frijol separados electroforéticamente en geles de Agarosa. MC=ADN del bacteriófago Lambda a 100 ng.µl<sup>-1</sup>. 1-39= muestras de frijol analizadas en el presente estudio.

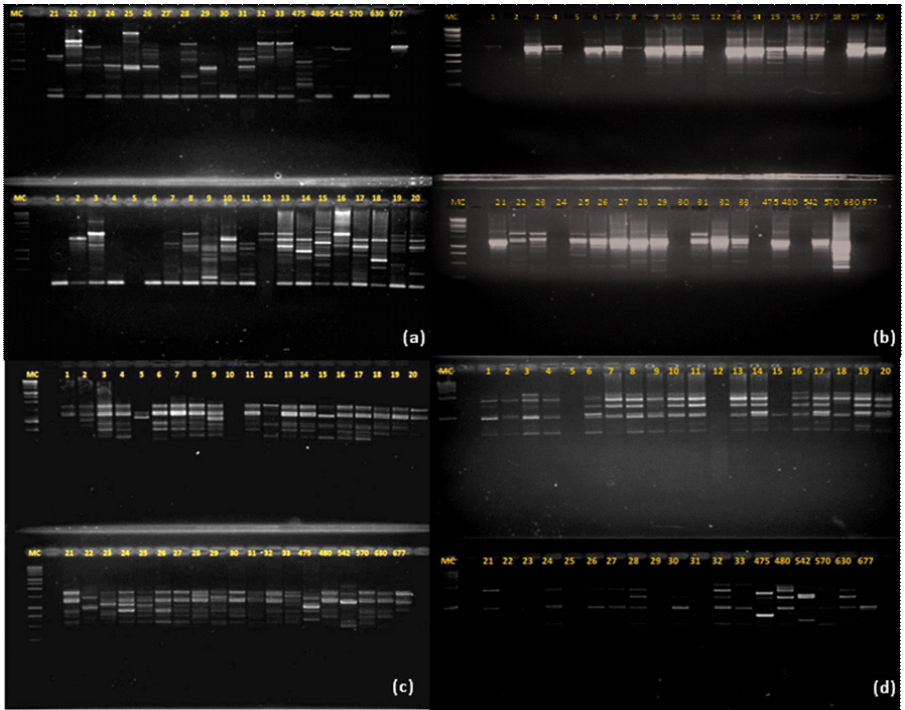
**Figure 1.** DNA of 30 cowpea samples separated electrophoretically in agarose gels. MC=DNA of the Lambda bacteriophage at 100 ng.µl<sup>-1</sup>. 1-39= cowpea samples analyzed in the current research.

en el presente trabajo (Niu *et al.*, 2008). Sharma *et al.* (2011) reportaron una metodología efectiva para el aislamiento de ADN de calidad en especies de *Vigna*, sin el uso de reactivos tóxicos y de bajo costo. Sin embargo, los rendimientos estuvieron por debajo de los reportados en el presente trabajo. El ADN aislado fue adecuado para las pruebas de amplificación y permitió obtener patrones de bandas específicos al ser amplificados con los oligonucleótidos de anclaje al azar utilizados en el presente trabajo.

Las pruebas RAPD posibilitaron la formación de patrones de bandas en todos los genotipos de *Vigna* estudiados con cuatro de los cebadores estudiados (figura 2). Los marcadores RAPD fueron efectivos para establecer diferencias entre las accesiones estudiadas. Similarmente, Muthusamy *et al.* (2008) determinaron que los

were efficient for the genetic identification of *V. umbellate* populations, finding PIC values of 0.243 being superior to the ISSR markers. Ullah *et al.* (2010) showed the efficiency of the RAPD markers for the genetic identification of the *V. radiate* accessions, affirming that these markers were more effective for the genetic identification of *Vigna* than the isoenzymatic markers or the RFLP markers. Likewise, Ba *et al.* (2004) showed the effectiveness of the RAPD markers in the analysis of the genetic diversity in *V. unguiculata*. The effectiveness of these markers in the identification and study of the genetic diversity in *V. unguiculata* was also reported by Asare *et al.* (2010), Ba *et al.* (2004) and Malviya *et al.* (2012).

Out of the 21 sequences used to amplify at random the DNA under research, only 10 primers were capable



**Figura 2.** Productos de amplificación RAPD para las 39 muestras estudiadas con (a) Primer OPA07, (b) Primer OPE02, (c) Primer OPE07 y (d) OPE15. MC= marcador de peso molecular comercial Ladder 1kb.

**Figure 2.** RAPD amplification products for the 39 studied samples with (a) OPA07 primer, (b) OPE02 Primer, (c) OPE07 primer and (d) OPE15. MC= commercial molecular weight marker Ladder 1kb.

RAPD fueron eficientes para la identificación genética de poblaciones de *V. umbellata*, encontrando valores de PIC de 0,243 siendo superior a los marcadores ISSR. Ullah *et al.* (2010) demostraron la eficiencia de los marcadores RAPD para la identificación genética de accesiones de *V. radiata*, afirmando que estos marcadores resultaron ser más efectivos para la identificación genética de *Vigna* que los marcadores isoenzimáticos o los

of amplifying fragments in the samples; therefore, only 43% of the sequences were effective in amplifying DNA of the *Vigna* genre. Similar results were obtained by Fall *et al.* (2003) in relation to the capacity of amplifying fragments where almost 50% of the primers used did not amplify any fragment or were not capable of discriminating among *V. unguiculata* genotypes. Primers produced a rank from medium to high of band patterns,

marcadores RFLP. Así mismo, Ba *et al.* (2004) demostraron la efectividad de los marcadores RAPD en el análisis de la diversidad genética en *V. unguiculata*. La efectividad de estos marcadores en la identificación y estudio de diversidad genética en *V. unguiculata* también fue reportada por Asare *et al.* (2010), Ba *et al.* (2004) y Malviya *et al.* (2012).

De las 21 secuencias utilizadas para amplificar al azar los ADN de *Vigna* bajo estudio, solo 10 cebadores fueron capaces de amplificar fragmentos en las muestras; por lo tanto, solo el 43% de las secuencias fueron efectivas en amplificar ADN del género *Vigna*. Resultados similares en cuanto a capacidad de amplificar fragmentos fueron obtenidos por Fall *et al.* (2003) donde cerca del 50% de los primers utilizados o no lograron amplificar ningún fragmento o no fueron capaces de discriminar entre genotipos de *V. unguiculata*. Los cebadores lograron producir un rango medio a alto de patrones de bandas, a excepción del primer OPE-05, el cual tuvo un nivel bajo de discriminación entre los genotipos analizados (cuadro 3).

Los valores mayores de número de patrones se obtuvieron con uno de los cebadores de la serie OPE y el cebador de la serie OPA utilizado. Se hace necesario probar otros cebadores a fin de explorar la posibilidad de generar un mayor grado de polimorfismos, especialmente las series OPA, OPB y OPF, las cuales han logrado generar altos niveles de polimorfismo en genotipos de *V. unguiculata* (Fall *et al.*, 2003). Esto concuerda con lo obtenido por Ba *et al.*

excepting primer OPE-05, which had a low discrimination value among the analyzed genotypes (table 3).

The higher values of number of patterns were obtained with one of the primers of the OPE series and the primer used of the OPA series. It is necessary to test other primers with the aim of exploring the possibility of generating a higher degree of polymorphisms, especially to the series OPA, OPB and OPF, which have generated high polymorphisms levels in genotypes of *V. unguiculata* (Fall *et al.*, 2003). The latter agreed to Ba *et al.* (2004) who obtained a high polymorphisms degree with the OPA series; meanwhile, the values of the OPE series were low for the cultivated genotypes, showing a higher degree of polymorphisms for the wild genotypes. However, even when there is a wide range of studies that revealed the importance of the RAPD for the genetic identification and the mutant identification in *Vigna* sp., there is not any precise information about which primers would be more recommendable to analyze the species genetically.

A total of 180 RAPD bands were generated with the primers that showed the highest polymorphisms (table 4), which might be considered as satisfactory for the statistical analyzes of the results, especially if considering that approximately 18 bands were generated per each primer. The polymorphism level obtained was 67%, considered as a medium percentage to discriminate among the genotypes studied. Primers OPE-02, OPE-07, OPE-15 and OPA-07 were the most recommendable sequences for

**Cuadro 3. Número de patrones de bandas generados en 39 muestras de (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) por cada primer bajo estudio.****Table 3. Pattern number of bands generated in 39 samples of (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) by each primer under research.**

OPE 01	8	OPE 12	0
OPE 02	19	OPE 13	0
OPE 03	15	OPE 14	0
OPE 04	8	OPE 15	12
OPE 05	3	OPE 16	0
OPE 06	0	OPE 17	0
OPE 07	12	OPE 18	0
OPE 08	0	OPE 19	12
OPE 09	0	OPE 20	9
OPE 10	0	OPA 07	19
OPE 11	0		

(2004) quienes obtuvieron un alto grado de polimorfismo con la serie OPA, mientras que los valores de la serie OPE fueron bajos para los genotipos cultivados, mostrando un mayor grado de polimorfismos para los genotipos silvestres. Sin embargo, aun con la amplia gama de trabajos que revelaron la importancia de los RAPD para la identificación genética y la identificación de mutantes en *Vigna* sp., todavía no hay una información precisa acerca de cuáles cebadores serían los más recomendables para analizar genéticamente la especie.

Se generaron un total de 180 bandas RAPD, con los cebadores que demostraron los mayores polimorfismos (cuadro 4), lo cual podría ser considerado como satisfactorio para el análisis estadístico de los resultados, sobre todo si se tiene en cuenta que se generaron aproximadamente 18 bandas en promedio por cada cebador. El nivel de polimorfismo obtenido fue de 67%, lo cual se consideró como un porcentaje

obtaining polymorphisms in *Vigna* genotypes. Nevertheless, the content values of polymorphic information were extremely low, maybe due to the fact that most of the generated bands were present in few of the genotypes studied.

The values of the standard error were also low which confirmed that the results were consistent and statistically trustable. Similar CIP values were obtained for samples of *V. unguiculata* by Ba *et al.* (2004), meanwhile, for *V. radiata* and *V. umbellata* the CIP values were higher to 0.125; which contrasted to the current research, where the CIP values were averagely equal for all the species studied.

The results of the hierarchical conglomerate analysis performed are shown on figure 3. The data was analyzed using the grouping association method for transformed data by the expression  $Y = X - (\text{media}/\text{standard deviation})$ . The coefficient of the cophenetic correlation was 0.905;



**Cuadro 4. Porcentaje de bandas polimórficas (% BP) y contenido de información polimórfica asociados a los 10 iniciadores utilizados para la caracterización molecular de 39 individuos de frijol común (*Vigna unguiculata* (L). Walp.).**

**Table 4. Percentage of polymorphic bands (% BP) and content of polymorphic information associated to the 10 initiators used for the molecular characterization of 39 individuals of common cowpea (*Vigna unguiculata* (L). Walp.).**

Iniciador	Nº Bandas	NBP	% BP	CIP	EES
OPE 01	9	5	55,56	0,07	0,04
OPE 02	22	19	86,36	0,04	0,01
OPE 03	34	15	44,11	0,05	0,01
OPE 04	19	8	42,10	0,08	0,02
OPE 05	3	2	66,67	0,04	0,02
OPE 07	23	21	91,30	0,04	0,01
OPE 15	16	13	81,25	0,07	0,03
OPE 19	19	10	52,63	0,00	0,00
OPE 20	13	9	69,23	0,00	0,00
OPA 07	22	19	86,36	0,03	0,02
Total	180	121	67,21	0,04	0,02

NBP= Número de Bandas Polimórficas. CIP= contenido de información polimórfica. EES= error estándar

medio para poder discriminar entre los genotipos estudiados. Los cebadores OPE-O2, OPE-07, OPE-15 y OPA-07 fueron las secuencias más recomendables para la obtención de polimorfismos en genotipos de *Vigna*. No obstante, los valores del contenido de información polimórfica fueron extremadamente bajos, posiblemente debido al hecho que la gran mayoría de las bandas generadas estuvieron presentes en pocos de los genotipos estudiados.

Los valores del error estándar también fueron bajos lo cual confirmó que los resultados fueron consistentes y estadísticamente confiables. Valores similares de CIP fueron obtenidos para muestras de *V. unguiculata* por Ba *et al.* (2004), mientras que para *V.*

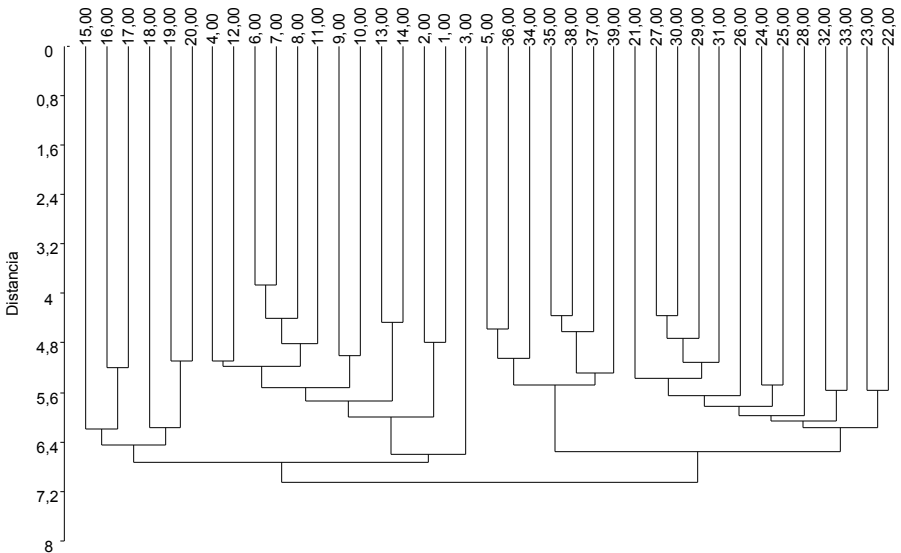
considered representative of the general variability of the studied population.

Performing a Boothtrapping test with 1000 replications the results showed that the general division in two big groups was obtained in 100% of the cases and the separations among the two sub-groups were obtained in more than 70% of the replications. It was observed the separation of four big sub-groups. The first formed by the samples from 15 to 20, which mostly corresponded to genotypes of the West Coast of Maracaibo's Lake and Guajira. These were genotypes with brown seeds, excepting material 15 which was a black cowpea coming from the West Coast of Maracaibo's Lake of Maracaibo, in Zulia state.

*radiata* y *V. umbellata* los valores de CIP fueron superiores a 0,125; lo cual contrastó con el presente trabajo, donde los valores de CIP en promedio fueron iguales para todas las especies estudiadas.

Los resultados del análisis de conglomerado jerárquico realizado se muestran en la figura 3. Los datos se analizaron utilizando un método de asociación de grupos para datos transformados por la expresión  $Y = X - (\text{media}/\text{desviación estándar})$ . El coeficiente de correlación cofenética fue de 0,905; considerándose representativo de la variabilidad general de la población estudiada.

The second sub-group was formed by the samples from 1 to 14 and was related to the previous group. These genotypes presented seeds with black color and all coming from Zulia state. The mutants and genotypes S5 selected by the Universidad del Zulia (LUZ) were present as well as a genotype collected in Turén, Portuguesa state. The black material from Turén was much linked to sample 4 which corresponded to a black mutant selected at LUZ. In this subgroup, the separation of the sample 3 was outstanding as a different element, since it was about a dwarf black mutant. Likewise, the



**Figura 3.** Dendrograma obtenido para las 39 muestras de *Vigna* analizadas, usando el método de agrupamiento de grupos pareados y la distancia Euclídeana para datos transformados.

**Figure 3.** Dendrogram obtained for the 39 samples of analyzed *Vigna* using the grouping method of paired groups and the Euclidean distance for the transformed data.

Al realizar una prueba de Boothtrapping con 1000 repeticiones, los resultados mostraron que la división general en dos grandes grupos se obtuvo en el 100% de los casos, y que las separaciones dentro de los dos subgrupos se obtuvieron en más del 70% de las repeticiones. Se observó la separación de cuatro grandes subgrupos. El primero formado por las muestras 15 al 20, las cuales correspondieron en su mayoría a genotipos de la Costa Oriental del Lago de Maracaibo y la Guajira. Fueron genotipos con semillas marrones o bayas, a excepción del material 15 que fue un frijol negro, proveniente de la Costa Oriental del Lago de Maracaibo, en el estado Zulia.

El segundo subgrupo estuvo formado por las muestras del 1 al 14, y estuvo relacionado con el grupo anterior. Estos genotipos presentaron semillas de color "ojo negro" y todos provenientes del estado Zulia. Allí estuvieron presentes los mutantes y los genotipos en S5 seleccionados por la Universidad del Zulia (LUZ) y un genotipo recolectado en Turén, estado Portuguesa. El material "ojo negro" de Turén, apareció estrechamente relacionado con la muestra 4, que correspondió a un mutante "ojo negro" seleccionado en LUZ. En este subgrupo llamó la atención la separación de la muestra 3 como un elemento aparte, ya que se trató de un mutante ojo negro enano. De igual modo, la semejanza entre las muestras 1 y 2, las cuales se han descrito como un material original ojo negro proveniente del municipio Mara, del estado Zulia, y la segunda como un mutante ojo negro seleccionado en LUZ. Finalmente se incluyeron en este

similarity among samples 1 and 2, which have been described as a black material from Mara parish, Zulia state, and the second as a black material selected at LUZ. Finally, two samples coming from San Joaquín (Zulia state) were included in this sub-group which were black. The third sample of this location located in the first sub-group already mentioned.

A third sub-group formed by samples 5 and from 34 to 39. These genotypes corresponded to the reference samples coming from the germplasm collection of CENIAP, where there were genotypes of *V. unguiculata*, *V. radiata*, *V. umbellate* and a *Vigna* material, which has not yet been identified at the species level. Sample 5 was a *Vigna* genotype coming from Zulia state, which located close to sample 36 that corresponded to a *V. radiata* material coming from Zulia state.

The last sub-group was formed by genotypes of seeds with cream color coming from INIA-CENIAP, the genotypes with seeds with cream color and coming from Florida, and two genotypes with black color coming from Colombia and Perú, respectively. It is possible that the genotypes with black color that formed a separate block inside this sub-group, were genetically related to the genotypes of *V. unguiculata* with seeds of cream color coming from Florida. Generally, it is considered that the population studied has a narrow relation in between.

The average index of genetic diversity of Margaleff was of 2.69, and values of this index under 5.0 corresponded to a low genetic diversity. This was corroborated when calculating the

subgrupo dos muestras provenientes de San Joaquín (estado Zulia) las cuales fueron de color negro. Es de hacer notar que la tercera muestra de esta localidad se ubicó en el primero de los subgrupos mencionados.

Un tercer subgrupo estuvo conformado por las muestras 5 y del 34 al 39. Estos genotipos correspondieron a muestras de referencia provenientes de la colección de germoplasma del CENIAP, donde hubo genotipos de *V. unguiculata*, *V. radiata*, *V. umbellata* y un material del género *Vigna*, el cual no ha sido identificado todavía a nivel de especie. La muestra 5 fue un genotipo de *Vigna* proveniente del estado Zulia, el cual se ubicó muy cercano a la muestra 36, la cual correspondió a un material de *V. radiata*, procedente del estado Zulia.

El último subgrupo se compuso de genotipos de semillas color crema, procedentes del INIA-CENIAP, los genotipos con semillas color crema y bayo procedentes de Florida, y dos genotipos “ojo negro” uno procedente de Colombia y el otro recolectado en Perú. Es posible que los genotipos “Ojo Negro”, que conformaron un bloque separado dentro de este subgrupo, estuvieron relacionados genéticamente con los genotipos de *V. unguiculata* con semillas crema provenientes de Florida. En líneas generales se considera que la población estudiada tiene una diversidad genética estrecha. Es decir, los genotipos están estrechamente relacionados entre sí.

El índice de diversidad genética de Margaleff promedio fue de 2,69; por lo que valores de este índice por debajo de 5,0 correspondieron a baja diversidad genética. Esto se corrobora

diversity index of Shannon, which value was of 1.48. For this diversity index values higher to 3.0 were expected in the case of the genotypes with high genetic diversity.

These values low of genetic diversity, even when there were genotypes of three different species, might be due to the selected primers explored a part of the genome that would be preserved in the *Vigna* genre, reinforcing the idea of using different primers with the aim of exploring different regions of the genome and have a more accurate estimation of the diversity.

On the other hand, even with an apparent low diversity, the genotypes selected in Zulia state formed a different group indicating that these presented characteristics that identify them as a local group; thus, justifying their preservation. This material becomes into a valuable resource that needs further exploration with other primers to establish a better genetic identity. The values low in diversity are expected for an introduced crop such as cowpea, and the differences among the areas might be explained by the geographic isolation of La Guajira and the West Coast of Maracaibo's Lake, which inter-connection is relatively new.

## Conclusions

There is an effective DNA isolation strategy that allows obtaining an intact molecule and mostly pure in sufficient concentrations to carry out tests with molecular markers selected for the current study. RAPD markers allowed obtaining a band pattern

ró al calcular el índice de diversidad de Shannon, cuyo valor fue 1,48. Para este índice de diversidad, se esperaban valores superiores a 3,0 en el caso de genotipos con alta diversidad genética.

Estos valores bajos de diversidad genética, aun cuando hubo genotipos de tres especies diferentes, podría deberse a que los cebadores seleccionados exploraron una parte del genoma que estaría conservada en el género *Vigna*, reforzándose la idea de utilizar cebadores diferentes a fin de explorar diferentes regiones del genoma y tener una estimación de la diversidad sobre bases más ciertas. Por otro lado, llamó la atención que aun cuando la aparente baja diversidad, los genotipos seleccionados en el estado Zulia conformaron un grupo aparte, pareciendo indicar que presentaron características que los identificaron como un grupo o raza local, justificándose así su preservación. Este material se convierte en un recurso valioso al que hay que seguir explorando con otros cebadores para establecer mejor su identidad genética. Los valores bajos de diversidad son esperados para un cultivo introducido como lo es el frijol, y las diferencias entre zonas podrían explicarse por el aislamiento geográfico de la Guajira y la Costa Oriental del Lago de Maracaibo, cuya interconexión es relativamente reciente.

## Conclusiones

Se cuenta con una estrategia de aislamiento de ADN efectiva, que permite la obtención de una molécula intacta y en su mayoría pura, en concentraciones suficientes para realizar

características para los genotipos y fueron efectivas en establecer diferencias entre ellos para el estudio de la diversidad genética.

Los cebadores de la serie OPE permitieron evidenciar un nivel medio de polimorfismos con un nivel muy bajo de información polimórfica. Sin embargo, las bandas permitieron una separación genética de los genotipos. Se recomienda explorar el genoma de estos genotipos con otros marcadores RAPD con mayor capacidad de discriminación con el fin de corroborar los resultados.

Los genotipos estudiados fueron divididos en cuatro sub-grupos por su procedencia geográfica y en algunos casos el color de la semilla fue determinante. En general la diversidad genética estudiada fue considerada baja, posiblemente por explorar regiones conservadas del genoma en el género *Vigna*. Con una base genética restringida es difícil establecer programas de mejoramiento genético exclusivamente con los genotipos estudiados. El grupo de genotipos del estado Zulia presenta características que los identifican como un grupo aislado, posiblemente convirtiéndolos en una semilla local, compatible con el desarrollo histórico de la introducción del cultivo y la geografía del estado Zulia.

*End of english version*

---

las pruebas con marcadores moleculares seleccionados para el presente estudio. Los marcadores RAPD permitieron obtener un patrón de bandas características para los genotipos

estudiados y fueron efectivos en establecer diferencias entre los mismos para el estudio de la diversidad genética.

Cebadores de la serie OPE permitieron evidenciar un nivel medio de polimorfismo con un valor muy bajo de contenido de información polimórfica. Sin embargo, las bandas permitieron una separación genética de los genotipos. Se recomienda explorar el genoma de estos genotipos con otros marcadores RAPD con mayor capacidad de discriminación a fin de corroborar los presentes resultados.

Los genotipos bajo estudio se dividieron en cuatro subgrupos por su procedencia geográfica y en algunos casos fue determinante el color de la semilla. En líneas generales la diversidad genética estudiada se consideró baja, posiblemente por explorar regiones del genoma muy conservadas en el género *Vigna*. Con una base genética estrecha se dificulta establecer programas de mejoramiento genético utilizando exclusivamente los genotipos estudiados. El grupo de genotipos del estado Zulia presenta características genéticas que los identifica como un grupo aislado, posiblemente convirtiéndolos en una raza local, lo cual es compatible con el desarrollo histórico de la introducción del cultivo y la geografía de la zona del estado Zulia.

## Literatura citada

- Alam, S., R. Tasmin, I. Jahan, M.A. Habib y S.S. Sultana. 2013. Fluorescent banding and RAPD analysis of five cultivars in *Vigna unguiculata* ssp. *Sesquipedalis* (L.) Verdc. *Cytologia* 78(1):73-79.
- Arámbulo, M., Z. Olivares, N. Valbuena y M. Marín. 2007. Tasa fotosintética de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. durante su desarrollo reproductivo. *Comp. Fac. Agron. (LUZ)*. B-1.
- Asare, A.T., B.S. Gowda, I.K.A. Galyuon, L.I. Aboagye, J.F. Takrama, y P. Timko. 2010. Assessment of the genetic diversity in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) germplasm from Ghana using simple sequence repeat markers. *Plant Genetic Resources* 8:142-150.
- Ávila-Serrano, N.Y., B. Murillo-Amador, J.L. Espinoza-Villavicencio, A. Palacios-Espinosa, A. Guillén-Trujillo, R. De Luna-De La Peña y J.L. García-Hernández. 2010. Modelos de predicción del rendimiento de grano y caracterización de cinco cultivares de frijol y orimón. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12:11-18.
- Ba, F.S., R.S. Pasquet y P. Gepts. 2004. Genetic diversity in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evol.* 51:539-550.
- Balarezo, J.C., F. Camarena, J.P. Baudoin, A. Huaranga y R.B. Sevillano. 2009. Evaluación agromorfológica y caracterización molecular de la ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.). *IDESIA* 27(1):29-40.
- Blair, M., W. Pantoja y R. Hidalgo. 2007. Diversidad de faseolinas en frijol común cultivado del Caribe. *Acta Agron.* 56(4):171-176.
- Choudhary, K., N. Mathur, O.P. Choudhary y U. Pillai. 2008. Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh leaves of *Vigna* species suitable for RAPD and restriction digestion. *Advan. Biol. Res.* 2(5-6):83-89.
- CIAT. 1999. Taller integración de fitopatología, mejoramiento y biología molecular para el desarrollo de resistencia al añublo del arroz. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Octubre 14-18, Cali, Colombia.
- Dellaporta, S.J., J. Wood y J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Rep.* 1:19-21.

- Fall, L., D. Diouf, M.A. Fall-Ndiaye, F.A. Badiane y M. Gueye. 2003. Genetic diversity in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] varieties determined by ARA and RAPD techniques. African Journal of Biotechnology 2(2):48-50.
- FAO. 2011. FAOSTATS. Estadísticas de producción de cultivos. Disponible en: <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=567&lang=es#ancor>, Consultada el 22/10/2011.
- Faris, D.G. 1965. The origin and evolution of the cultivated forms of *Vigna sinensis*. Canadian Journal of Genetics and Cytology 7(3):433-445.
- FEDEAGRO. 2011. Estadísticas agrícolas. Producción agrícola subsector vegetal. Disponible en: <http://www.fedeagro.org/producción/default.asp>. Consultada el 22-10-11.
- García, M. y P. Madriz. 1999. Anatomía foliar comparada de cinco genotipos de frijol mungo, *Vigna radiata* (L.) Wilczek. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 16: 610-620.
- Gebauer, J., E. Luedeling, K. Hammer, M. Nagieb y A. Buerkert. 2007. Mountain oases in northern Oman: An environment for evolution and *in situ* conservation of plant genetic resources. Genetic Resources and Crop Evolution 54(3):465-481.
- González, A.M., A.P. Rodiño, A.M. de Ron Pedreira, M. Lema, E.M. Santalla y M. Pérez. 2006. Colección de germoplasma de leguminosas de la Misión Biológica de Galicia-CSIC. Resúmenes 2da Jornadas de la Asociación Española de Leguminosas. p. 201-206.
- Gupta, P., R. Singh, S. Malhotra, K.S. Boora y H.R. Singal. 2010. Characterization of seed storage proteins in high protein genotypes of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. Physiology and Molecular Biology of Plants 16(1):53-58.
- Gutiérrez, M., D. Pérez, A. Márques, V. Segovia y C. Marín. 2004. Prospección y recolección de genotipos nativos del género *Phaseolus* en la zona nororiental y andina de Venezuela. Noticiario de recursos fitogenéticos. FAO. IPGRI (Italia). 140:32-41.
- Hoc, P.S., R.A. Palacios y M.P. Mom. 2006. Novedades en especies de *Vigna* e Inga (Leguminosae) para la Argentina. Bol. Soc. Argent. Bot. 41(3-4):331-332.
- Horne, E.C., S.P. Kumpatla, K.A. Patterson, M. Gupta y S.A. Thompson. 2004. Improved high-throughput sunflower and cotton genomic DNA extraction and PCR fidelity. Plant Mol. Biol. Rep. 22:83a-83i.
- Keb-Llanes, M., G. González, B. Chi-Manzanero, D. Infante. 2002. A rapid and simple method for small-scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. Plant Mol. Biol. Rep. 20:299a-299e.
- Levene, H. 1960. Robust tests for equality of variances. p. 278-292. En: I. Olkin, S.D. Gurye, W. Hoeffding, W.G. Madow y H.B. Mann (Eds.). Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling. Stanford University Press. California, USA.
- Madriz, P. y J.F. Luciani. 2002. Caracterización morfológica de 20 genotipos de frijol mungo (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Rev. Fac. Agron. (LUZ). 28:27-39.
- Malviya, N., B.K. Sarangi, M.K. Yadav y D. Yadav. 2012. Analysis of genetic diversity in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cultivars with random amplified polymorphic DNA markers. Plant Systematics and Evolution 298(2):523-526.
- Margalef, D.R. 1958. Information Theory in Ecology. General Systematics 3:36-71.
- Mbagwu, F.N. y H.O. Edeoga. 2006. Histochemical studies on some Nigerian species of *Vigna savi* (Leguminosae-Papilionoideae). Journal of Agronomy 5(4):605-608.
- Muthusamy, S., S. Kanagarajan y S. Ponnusamy. 2008. Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. Electronic Journal of Biotechnology 11(3). Disponible en: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol11/i-ssue3/full/8/>. Consultado el 26/10/11.

- Niu, Ch., H. Kebede, D.L. Auld, J.E. Woodward, G. Burow y R.J. Wright. 2008. A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment. *African Journal of Biotechnology* 7(16):2818-2822.
- Padulosi, S. y N.Q. Ng. 1997. Origin, taxonomy and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. p. 1-12. En: B.B. Singh, D.R. Mohan Raj, K.E. Dashiell y L.E.N. Jackai (Eds.). *Advances in cowpea research*. International Institute of Tropical Agriculture.
- Panella, L. y P. Gepts 1992. Genetic relationships within *Vigna unguiculata* (L.) Walp. based on isozyme analyses. *Genetic Resources and Crop Evolution* 39(2):71-88.
- Patil, D.M., S.V. Sawardekar, N.B. Gokhale, S.G. Bhave, S.S. Sawant, S.A. Sawantdesai, K.A. Lipne, S.N. Sabale y S.N. Joshi. 2013. Genetic diversity analysis in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] by using RAPD markers. *International Journal of Innovative Biotechnology and Biochemistry* 1(1):15-23.
- Piccirilo, G.A. y A. Higuera. 1997. Estudio de insectos polinizadores en el frijol, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. y su efecto en el rendimiento. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 14:307-314.
- Roldán-Ruiz, I., J. Dendauw, E. Van Bockstaele, A. Depicker y M. De Loose. 2000. AFLP Markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Mol. Breed* 6:125-134.
- Roopa, L.G. y S.A. Ranade. 2013. Comparative analysis of morphological and molecular diversity in Mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Trends in Bioscience* 6(2):146-151.
- Shannon, C.E. y W. Weaver. 1949. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press. Urbana, IL, EEUU. 144 p.
- Shapiro, S. y M. Wilk. 1965. Analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52(3-4):591-611.
- Sharma, S.N., V. Kumar, G. Singh y R. Sharma. 2011. A modified DNA extraction protocol and its utility in seed genetic purity assessment. *Seed Science and Technology* 39(1):236-242.
- Singh, P. y C.S. Kar. 2013. Assessment of molecular variation in some elite lines of blackgram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. *Annals of Agri Bio Research* 18(2):157-163.
- Simon, M.V., A.M. Benko-Iseppon, L.V. Resende, P. Wintery G. Kahl. 2007. Genetic diversity and phylogenetic relationships in *Vigna savi* germplasm revealed by DNA amplification fingerprinting. *Genome* 50:538-547.
- Shivakumar, P., S. Rajesh, R. Gnanam y A. Manickam. 2011. Effect of *in vitro* culture conditions on somaclonal variation in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) using RAPD markers. *Acta Biologica Hungarica* 62(1):34-44.
- Sony, S.K., A. Habib y M.N. Islam. 2012. Genetic diversity analysis of thirteen mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) cultivars using RAPD markers. *Bangladesh J. Bot.* 41(2):169-175.
- Ullah, H., I.H. Khalil, D. Lightfoot, I. Ullah, R. Hidayat-Ur. 2010. Estimation of genetic divergence among elite mungbean (*Vigna radiata*) genotypes by RAPD analysis. *Biological Diversity and Conservation*. 3(1):75-82.
- Warburg, O. y W. Christian. 1942. Isolation and crystallization of enolase. *Biochem. Z.* 310:384-421.