

# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**CENTRO DE  
BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**  
REYNOSA, TAMAULIPAS.

“ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE UNA  
COLECCIÓN INÉDITA DE *Phaseolus vulgaris* L.  
(SILVESTRES X CULTIVADOS) DEL INIFAP”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA

PRESENTA:  
VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ LÓPEZ

DIRECTORES DE TESIS:  
Dr. NETZAHUALCOYOTL MAYEK PÉREZ  
M. C. MA. LUISA PATRICIA VARGAS VAZQUEZ

Febrero de 2010

Cd. Reynosa, Tamaulipas



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de Reynosa, Tam. el día 26 del mes Febrero del año 2010, el (la) que suscribe Victor Manuel Hernández López alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica con número de registro B071082, adscrito a Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Netzahualcóyotl Mayek Pérez y la M.C. Ma. Luisa Patricia Vargas Vázquez y cede los derechos del trabajo intitulado "Análisis de la diversidad genética de una colección inédita de *Phaseolus vulgaris* L. (silvestres x cultivados) del INIFAP" al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección Blvd. del Maestro esq. con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México Tels. 01-899 9243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Victor Manuel Hernández López  
Nombre y firma



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa, Tam. siendo las 12:00 horas del día \_\_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CBG para examinar la tesis titulada:  
Análisis de la diversidad genética de una colección inédita de Phaseolus vulgaris L. (silvestres x cultivados) del INIFAP.

Presentada por el alumno:

|   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |
|---|---|--|---|---|---|---|---|---|---|
| <u>Hernández</u><br><small>Apellido paterno</small>   | <u>López</u><br><small>Apellido materno</small> | <u>Victor Manuel</u><br><small>Nombre(s)</small> |   |   |   |   |   |   |   |
| Con registro:   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |
| <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">B</td> <td style="padding: 2px;">0</td> <td style="padding: 2px;">7</td> <td style="padding: 2px;">1</td> <td style="padding: 2px;">0</td> <td style="padding: 2px;">8</td> <td style="padding: 2px;">2</td> </tr> </table> |   |  | B | 0 | 7 | 1 | 0 | 8 | 2 |
| B   | 0   | 7  | 1 | 0 | 8 | 2 |   |   |   |

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

  
 \_\_\_\_\_  
 Dr. Netzahuacóyotl Mayek Pérez

  
 \_\_\_\_\_  
 M.C. Ma. Luisa Patricia Vargas Vázquez

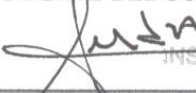
  
 \_\_\_\_\_  
 Dr. Juan Manuel González Prieto

  
 \_\_\_\_\_  
 M.C. Victor Ricardo Moreno Medina

  
 \_\_\_\_\_  
 M.C. Sanjuana Hernández Delgado



EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

  
 \_\_\_\_\_  
 Dr. Alberto Mendoza Herrera  
 INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
 CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA

AGRADEZCO DE MANERA ESPECIAL EL  
FINANCIAMIENTO DE ESTE TRABAJO AL FONDO:

FOMIX GOBIERNO DEL ESTADO DE VERACRUZ (94070)

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto Politécnico Nacional, líder en educación tecnológica vanguardista en México por brindarme las herramientas necesarias en mi desarrollo académico.

Al Centro de Biotecnología Genómica por facilitarme sus instalaciones durante la Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca para realizar mis estudios de Maestría.

Al Programa Institucional de Formación de Investigadores del Instituto Politécnico Nacional por la otorgarme la beca.

Al Espacio Común de Educación Superior por otorgarme la beca de movilidad Santander.

## **DEDICATORIA**

### ***A mis hermanos:***

*Jesús Hernández López, José Antonio García Hernández y Pablo Hernández de Luna... Por ser cómplices de mis travesuras en la niñez y compartir la culpa, aunque eso implicara llorar...*

### ***A mis primos:***

*Rubén García Hernández, Pedro García Hernández, Patricia García Hernández... Por recordarme que la infancia es una etapa sin igual...*

### ***A mi familia:***

*Antonio Hernández Gaona, Juana López López, Juana Hernández López, Andrés Hernández López, Anita Hernández López, Guadalupe de Luna Juárez, Zenaida Hernández López, Antonio Hernández López... Por ayudarme a construir mis sueños y apoyarme en cada momento...*

### ***A una niña muy especial:***

*Harlem "mi sueño anhelado" quien me brinda calma, serenidad y paz...*

***En general al pueblo mexicano por solventar gran parte de mi educación.***

## ÍNDICE DE CONTENIDO

|   | Página |
|---|--------|
| ÍNDICE DE CUADROS .....   | vi     |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....   | viii   |
| LISTA DE CLAVES Y ABREVIATURAS .....                                  | ix     |
| RESUMEN .....   | xi     |
| ABSTRACT.....   | xiii   |
| I. INTRODUCCIÓN.....  | 1      |
| II. ANTECEDENTES.....   | 2      |
| 2. 1 Generalidades del frijol.....                                    | 2      |
| 2.1.1 Importancia del frijol común .....                              | 2      |
| 2.1.2 Origen y domesticación .....                                    | 3      |
| 2.1.3 Razas y clases comerciales de <i>P. vulgaris</i> L. ....        | 4      |
| 2.3 Tipos de frijoles y su relación genética .....                    | 6      |
| 2.3.1 Frijol silvestre .....  | 6      |
| 2.3.2 Frijol domesticado .....  | 6      |
| 2.3.3 Complejo silvestre-semisilvestre-domesticado.....               | 7      |
| 2.4 Recursos fitogenéticos .....                                      | 9      |
| 2.4.1 Conservación .....  | 10     |
| 2.4.2 Caracterización y evaluación del germoplasma.....               | 11     |
| 2.4.3 Caracterización de colecciones núcleo de <i>Phaseolus</i> ..... | 15     |
| III. JUSTIFICACIÓN .....  | 16     |
| IV. OBJETIVOS .....   | 17     |
| V. HIPÓTESIS.....   | 18     |
| VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 19     |
| 6.1 Material genético .....   | 19     |
| 6.2 Análisis morfológico.....   | 20     |
| 6.3 Análisis genético.....  | 21     |
| 6.3.1 Aislamiento del ADN genómico.....                               | 21     |
| 6.3.2 Análisis SCAR.....  | 22     |
| 6.4 Análisis AFLP.....  | 22     |

|   |    |
|---|----|
| 6.5 Análisis estadístico .....                                | 26 |
| VII. RESULTADOS .....   | 28 |
| 7.1 Caracterización morfológica.....                          | 28 |
| 7.2 Caracterización molecular mediante marcadores SCAR.....   | 33 |
| 7.3. Caracterización molecular mediante marcadores AFLP ..... | 35 |
| VIII. DISCUSIÓN .....   | 43 |
| IX. CONCLUSIONES.....   | 52 |
| X. RECOMENDACIONES.....                                       | 53 |
| XI. LITERATURA CITADA .....                                   | 54 |
| XII. GLOSARIO.....  | 62 |



## ÍNDICE DE CUADROS

|           | Página   |
|-----------|--|
| Cuadro 1  | Acervo genético, razas y variedades populares de frijol..... 5   |
| Cuadro 2  | Origen geográfico del germoplasma que compone la colección inédita de <i>P. vulgaris</i> L..... 19   |
| Cuadro 3  | Descriptores morfológicos cualitativos y cuantitativos evaluados en la colección inédita de <i>P. vulgaris</i> L..... 20   |
| Cuadro 4  | Información de los marcadores tipo SCAR asociados con la resistencia a antracnosis y al tizón común, analizados en la colección inédita de <i>P. vulgaris</i> L. .... 23             |
| Cudro 5   | Condiciones de amplificación de los marcadores tipo SCAR asociados con la resistencia a antracnosis o tizón común analizados en la colección inédita de <i>P. vulgaris</i> L..... 25 |
| Cuadro 6  | Frecuencias relativas de las variables morfológicas cualitativas evaluadas en la colección inédita de <i>P. vulgaris</i> L..... 29   |
| Cuadro 7  | Frecuencias relativas de las variables morfológicas cualitativas evaluadas en la colección inédita de <i>P. vulgaris</i> L. por estados..... 30                                      |
| Cuadro 8  | Parámetros estadísticos de las variables cuantitativas evaluadas para la colección inédita de <i>P. vulgaris</i> L..... 31   |
| Cuadro 9  | Media aritmética de las variables morfológicas cuantitativas evaluadas en la colección inédita de <i>P. vulgaris</i> L. por estados. .... 32   |
| Cuadro 10 | Valores característicos del análisis de componentes principales para las variables morfológicas evaluadas en la colección inédita de <i>P. vulgaris</i> L... 33                      |
| Cuadro 11 | Vectores característicos para las variables morfológicas evaluadas en la colección inédita de <i>P. vulgaris</i> L con base en el análisis de componentes principales ..... 33       |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Cuadro 12 | Frecuencias relativas de los marcadores tipo SCAR detectados en la colección inédita de <i>P. vulgaris</i> L.....  | 35 |
| Cuadro 13 | Productos amplificados obtenidos con cuatro combinaciones de iniciadores AFLP utilizadas para el análisis de la diversidad genética en la colección inédita de <i>P. vulgaris</i> L..... | 37 |
| Cuadro 14 | Análisis de la diversidad genética de la colección inédita de <i>P. vulgaris</i> L. con base en datos AFLP y región geográfica de origen. ....   | 37 |
| Cuadro 15 | Análisis de la diversidad genética de la colección inédita de <i>P. vulgaris</i> L. con base en datos AFLP y origen geográfico.....  | 38 |
| Cuadro 16 | Coefficientes de correlación entre el número de accesiones y el índice de diversidad genética de la colección inédita de <i>P. vulgaris</i> L. con base en datos AFLP. ....              | 38 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|          | Página  |
|----------|---|
| Figura 1 | Diagrama que representa al complejo silvestre-semisilvestre-domesticado en un ambiente natural modificado, donde las cruzas se originan en todas direcciones. .... 8                          |
| Figura 2 | Dendrograma del germoplasma de la colección inédita de <i>P. vulgaris</i> L. con base en el estado de origen y variables morfológicas. .... 34  |
| Figura 3 | Productos amplificados AFLP de la colección inédita de <i>P. vulgaris</i> L. del INIFAP..... 36   |
| Figura 4 | Dendrograma de distancias genéticas de Nei y Dice con valores de bootstrap (1000 repeticiones) con base en el origen y los datos AFLP de la colección inédita de <i>P. vulgaris</i> L..... 39 |
| Figura 5 | ACoPs con base en el origen y los datos AFLP de la colección inédita de <i>P. vulgaris</i> L..... 40  |
| Figura 6 | Análisis bayesiano de la estructura genética de la colección inédita de <i>P. vulgaris</i> L con base en el estado de origen y datos AFLP ..... 41  |

## LISTA DE CLAVES Y ABREVIATURAS

%= por ciento

μL= microlitros

°C= grados centígrados

A= adenina

ACoP= Análisis de Coordinadas Principales

ACP = Análisis de Componentes Principales

ADN = Ácido Desoxirribonucleico

AFLP = Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados

ASERCA= Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria

C= citosina

CIAT= Centro Internacional de Agricultura Tropical

cm = centímetro

CV = Coeficiente de Variación

d= día

dNTPs = mezcla de trifosfatos de desoxinucleótidos (dATP + dGTP + dCTP + dTTP)

EDTA = sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético

g = gramo

G = guanina

h = horas

IBPGR= Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos

IN= Índice de diversidad de Nei

INIFAP = Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

IP= Índice de diversidad de Powell

L = litro

M = molar

mA = miliamper

MBG-CSIC= Grupo de Mejoramiento de Leguminosas de la Misión Biológica de Galicia y el Consejo Español de Investigación Científica.

min = minuto

NaCl = cloruro de sodio

ng  $\mu\text{L}^{-1}$  = nanogramos por microlitro

pb= pares de bases

PCR = Reacción en Cadena de la Polimerasa

pmol = picomoles

QTL= *Loci* de Caracteres Cuantitativos

RAPD = ADN Polimórfico Amplificado al Azar

RFLP= Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción

RL = buffer de restricción/ligación

rpm = revoluciones por minuto

s = segundos

SAGARPA= Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

SAMM= Selección Asistida por Marcadores Moleculares

SCAR= Secuencias Caracterizadas de Regiones Amplificadas

SSR = Secuencias Simples Repetidas

T = timina

TBE = tris/ácido bórico/sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético

TE = trizma/ ácido clorhídrico/ sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético

TEMED = N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamino

Tris-HCl = trizma/ácido clorhídrico

U  $\mu\text{L}^{-1}$  = unidades por microlitro

UPGMA = Método de agrupamiento de pares no ponderados con medias aritméticas

USDA = Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

V = voltios

v/v = volumen por volumen

x = por

X = veces de la concentración

## RESUMEN

México es centro de origen, domesticación y diversidad de *P. vulgaris* L. (frijol común). Dada la importancia económica, social, biológica, alimenticia y cultural que representa su cultivo se han diseñado estrategias para la conservación y manejo de su diversidad genética tanto de la forma cultivada como silvestre en bancos de germoplasma. Para poder entender los patrones de variación genética y reafirmar la riqueza y el potencial genético de las accesiones resguardadas es necesaria su caracterización y evaluación. El conocimiento de la diversidad genética del frijol común proporcionará una mejor visión tanto para su conservación como para su manejo y aprovechamiento en su calidad de recurso fitogenético. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la diversidad y las relaciones genéticas del germoplasma de frijol común de la colección inédita (silvestres x cultivadas) del INIFAP de México y valorar su utilidad en el mejoramiento genético de *Phaseolus*. El estudio incluyó 200 accesiones colectadas a través de 15 estados de México y que fueron caracterizadas con 12 descriptores morfológicos y con cuatro combinaciones de oligonucleótidos AFLP +3/+3. Además se analizó la presencia de seis marcadores tipo SCAR asociados con la resistencia al tizón común (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) y cuatro a la antracnosis (*Colletotrichum lindemithianum*). Los resultados indicaron variabilidad morfológica significativa en el germoplasma de frijol. El ACP de los datos morfológicos explicó más del 65 % de la variación total observada en los primeros tres CPs. Las características más descriptivas fueron: venación, días a emergencia y días a etapa V2. El germoplasma de Morelos fue el más diverso. El análisis AFLP amplificó 315 bandas (95.4 % polimórficas) e indicó alta diversidad genética en el germoplasma de las regiones norte-centro y centro del país. El germoplasma con mayores índices de diversidad genética proviene de Morelos, Guanajuato, Querétaro, Durango y Tamaulipas. El análisis de conglomerados de datos AFLP formó cuatro grupos genéticos con base en el origen, con valores de robustez mayores a 96 %. El ACoP de datos AFLP explicó 53 % de la variabilidad total observada y sus agrupamientos fueron diferentes en la mayoría de los casos del análisis de conglomerados. El análisis de la estructura genética de las poblaciones con enfoque Bayesiano mostró su mejor ajuste con  $K=4$  y la validez de los agrupamientos se ratificó con el ACoP. Los grupos no fueron consistentes a través de las formas de

clasificación y no mostraron una distribución de acuerdo con el origen geográfico o agroecológico. Sólo se detectaron tres marcadores SCAR para resistencia a antracnosis y cuatro para tizón común. El germoplasma de Guanajuato y Tlaxcala mostró las frecuencias más altas de SCARs de resistencia a ambas enfermedades. Los resultados indican que existe amplia variabilidad genética en el germoplasma de la colección inédita de *P. vulgaris* que reflejan la existencia de un patrón genético definido pero no agroecológico y, además, la presencia de genotipos con utilidad potencial como nuevas fuentes de resistencia a antracnosis y tizón común, particularmente de los estados de Guanajuato y Tlaxcala.

## ABSTRACT

Mexico is center of origin, domestication and diversity of *P. vulgaris* L. (common beans). Due the high economic, social, biological, food, and cultural relevance of common beans some strategies have been designed for conservation and management of genetic diversity of both cultivated and wild forms in proper gene banks. To understand the genetic variation patterns and to reinforce the richness and genetic potential of saved accessions we need to characterize and to evaluate the germplasm. Knowledge of common bean genetic diversity could give us a better view for conservation as well as management and use of these plant genetic resources. The aim of this work was to characterize the diversity and genetic relations of common bean germplasm included in a Mexican unpublished collection derived from wild x cultivated beans populations collected by INIFAP and to assess its usefulness for *Phaseolus* breeding. Work included 200 accessions collected through 15 states of Mexico and then characterized based on 12 morphologic descriptors as well as four +3/+3 oligonucleotide AFLP primer combinations. In addition, we analyzed the presence of six SCAR markers associated to common blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) resistance as well as four to anthracnose (*Colletotrichum lindemithianum*). Results indicated significant morphological variability in the common bean germplasm. PCA of morphologic data explained 65 % of total variation in the three major PCs. Most descriptive traits were venation, days to emergence and days to V2 stage. Germplasm from Morelos were the most morphologically diverse. AFLP analysis amplified 315 bands (95.4 % polymorphics) and revealed high genetic diversity in those germoplasma from north-center and center of Mexico. Germplasm from Morelos, Guanajuato, Querétaro, Durango, and Tamaulipas showed the highest diversity indexes. Cluster analysis of AFLP data showed four genetic clusters based on origin with bootstrap values higher than 96 %. PCoA of AFLP data explained 53 % of total genetic variability and clustering was different to those showed by cluster analysis. Population genetic structure analysis based in a Bayesian model showed the better adjusting to K= 4 and clusters were validated with PCoA results. Clusters were not consistent based on classification forms and they not showed the distribution based on geographical or agro-ecological origin. We only detected three SCAR markers associated to anthracnose resistance and four to common blight. Germplasm from



Guanajuato and Tlaxcala showed the highest SCAR frequencies for both diseases. Our results indicated the broad genetic variability in *P. vulgaris* unpublished collection germplasm which reflects the presence of defined genetic patterns but not based on agro-ecological origins and, in addition the presence of genotypes with potential usefulness to be used as new sources of resistance to anthracnose and common blight, particularly from the states of Guanajuato and Tlaxcala.

## I. INTRODUCCIÓN

México es centro de origen, domesticación y diversidad de plantas de importancia agrícola mundial como las del género *Phaseolus*. En orden de importancia, las especies cultivadas de dicho género son: *P. vulgaris* L., *P. coccineus* L., *P. lunatus* L., *P. acutifolius* Gray y *P. polyanthus* Greenm. Las cinco especies se encuentran ampliamente distribuidas en México, tanto en estado silvestre como cultivado (Miranda-Colín, 1990). En nuestro país, el frijol común tiene importancia económica, social, biológica, alimenticia y cultural (Avendaño-Arrazate *et al.*, 2004). Dada la trascendencia que esta planta representa para México y el mundo entero (Rodrigo-Míguez, 2000; Serrano y Goñi, 2004) se han desarrollado programas dirigidos a la conservación, manejo y caracterización de su diversidad (Jaramillo y Baena, 2000). Existen instituciones que resguardan el germoplasma de frijol, como el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en Cali, Colombia; el Grupo de Mejoramiento de Leguminosas de la Misión Biológica de Galicia y el Consejo Español de Investigación Científica (MBG-CSIC) en España; la USDA/ARS Western Regional Plant Introduction Station en Estados Unidos de Norteamérica y el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en México, que cuentan con colecciones de frijol en los bancos de germoplasma tanto de las formas cultivadas como silvestres (Rodrigo-Míguez, 2000; Vargas-Vázquez *et al.*, 2006).

Las colecciones almacenadas en los bancos de germoplasma pueden clasificarse en base, activa, de trabajo y núcleo (Jaramillo y Baena, 2000). Esta última reúne la mayor diversidad genética (del 70 al 80 %) de frijol en el menor número de accesiones y debido a las facilidades que ofrece para su manejo, fomenta la utilización del germoplasma (Frankel *et al.*, 1995). Para ello es necesario su caracterización y evaluación, mediante rasgos morfoagronómicos que se basan en características fenotípicas de alta heredabilidad como el hábito de crecimiento o el color de la flor; bioquímica, cuyo fundamento es el análisis de proteínas de reserva de la semilla como las faseolinas y las lecitinas. Con el avance de la biología molecular, la caracterización y evaluación de la diversidad genética ahora utiliza técnicas basadas en el análisis del ADN como los marcadores moleculares (Jaramillo y Baena, 2000; Kameswara-Rao, 2004).

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades del frijol

#### 2.1.1 Importancia del frijol común

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es de la segunda leguminosa más importantes en el mundo, sólo después de la soya [*Glycine max* (L.) Merr] (Rodrigo-Míguez, 2000; Serrano y Goñi, 2004). El frijol es cotizado principalmente por sus vainas verdes y granos tiernos y secos, aunque en algunos países de Latinoamérica y África se consumen las hojas y las flores jóvenes y tiernas como vegetales frescos (Singh *et al.*, 1991a). En México, el frijol tiene importancia económica, social, biológica, alimenticia y cultural (Avendaño-Arrazate *et al.*, 2004) pues tan solo durante el 2007 la superficie sembrada con frijol fue de 1.69 millones de hectáreas y fue la segunda especie más cultivada después del maíz (*Zea mays* L.). En ese año se obtuvo una producción de 0.99 millones de toneladas ( $0.67 \text{ ton ha}^{-1}$ ) (SAGARPA, 2009). Gracias a su amplia adaptación, el frijol se puede producir en todas las regiones agrícolas del país, en diversos sistemas de producción y épocas del año (Vargas-Vázquez *et al.*, 2006), dependiendo de la diversidad genética de las poblaciones nativas, debido a que la producción comercial se basa en este tipo de poblaciones (Avendaño-Arrazate *et al.*, 2004). Actualmente, el papel de esta leguminosa sigue siendo fundamental en el ámbito económico, porque representa para la economía campesina una fuente importante de ocupación e ingreso, así como una garantía de seguridad alimentaria vía el autoconsumo (Fanghanel, 1997). Además, el frijol es un alimento básico como fuente de proteínas, minerales, fibra, calorías y vitaminas para la dieta de los mexicanos, sobretodo en poblaciones rurales y urbanas de escasos recursos económicos (Avendaño-Arrazate *et al.*, 2004). El frijol es el complemento ideal de la dieta basada en maíz al sustituir la proteína de origen animal, proporcionando así una nutrición adecuada (Rodrigo-Míguez, 2000; Serrano y Goñi, 2004). Estudios clínicos han demostrado que el consumo regular de frijol ayuda en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad, cáncer y enfermedades del tracto digestivo, ya que reduce el nivel del colesterol y de la glucosa en la sangre (Aparicio-Fernández, 2008). El gran inconveniente del frijol es que contiene fitoquímicos

considerados antinutricios como los polifenoles (taninos condensados y antocianinas), inhibidores de proteasas (tripsina), lecitinas y ácido fítico (Carvalho y Sgarbieri, 1998; González-De Mejía *et al.*, 2005). La presencia de estos factores limitan el consumo del frijol y su eliminación requiere de la mejora genética y de tratamientos industriales como la cocción. La condición económica y las preferencias del consumidor hacen que el consumo *per cápita* del frijol común varíe de un país a otro y de una región a otra dentro de cada país. Así, encontramos que en las regiones del Golfo y del Sureste de México se consumen variedades con grano negro; en el Centro-Occidente se prefieren las variedades tipo Flor de Mayo, bayos o azufrados, mientras que en el Norte el consumo por las variedades azufradas se ha incrementado (Fanghanel, 1997). El consumo *per cápita* de frijol en México es de 11 kg año<sup>-1</sup> a diferencia de países africanos cuyo consumo es de hasta 40 kg año<sup>-1</sup> (Carvalho y Sgarbieri, 1998; González-De Mejía *et al.*, 2005). Además de todas las cualidades antes mencionadas, el frijol común se asocia de manera simbiótica con bacterias de género *Rhizobium* para fijar nitrógeno atmosférico (Vásquez-Arroyo *et al.*, 1998; Laeremans y Vanderleyden, 1998). Este fenómeno es de gran interés agronómico ya que constituye un medio biológico para aumentar el contenido del nitrógeno del suelo y reducir el uso de fertilizantes químicos nitrogenados, que son costosos y perjudiciales para el ambiente.

### **2.1.2 Origen y domesticación**

El frijol tiene su centro de origen en el Continente Americano donde las especies silvestres se distribuyen desde México hasta Argentina (Debouck, 1986). Según los registros arqueológicos, el frijol se originó de los 5 a los 2 mil años a. C. tanto en Mesoamérica como en los Andes. En Mesoamérica los registros más antiguos se encontraron en Coxcatlán, Puebla y Guila Naquitz, Oaxaca (México) y, en los Andes, en las cuevas del Guitarreo y El Callejón, Hualyas, Perú (Kaplan, 1965; Kaplan *et al.*, 1973; Smith, 2005). Para explicar el origen y domesticación del frijol se han realizado trabajos utilizando rasgos morfoagronómicos y moleculares de accesiones domesticadas y silvestres, de Latinoamérica (Koenig y Gepts, 1989; Singh *et al.*, 1991a; Singh *et al.*, 1991b; Islam *et al.*, 2001; Islam *et al.*, 2002b; Chacón *et al.*, 2005). Mediante el uso de rasgos fenotípicos se discernen dos áreas geográficas de domesticación: Mesoamérica y los Andes (Singh *et al.*, 1991a; Singh *et al.*, 1991b; Islam *et al.*, 2001). Las características

morfológicas mostradas entre germoplasma de dichas regiones son contrastantes y fáciles de diferenciar. Los rasgos agronómicos entre acervos también muestran diferencias significativas tales como los constituyentes del grano y la concentración de faseolinas (Islam *et al.*, 2001). Los marcadores bioquímicos y moleculares logran discernir los mismos dos acervos genéticos en *P. vulgaris*. pero además enfatizan la hipótesis de la posible existencia de un tercer centro de origen y domesticación, ubicado en el norte Andino (Koenig y Gepts, 1989; Islam *et al.*, 2001; Islam *et al.*, 2002b; Chacón *et al.*, 2005). Algunas de las accesiones del norte Andino, considerada zona de transición, muestran una base genética distinta a los dos acervos antes señalados. Gepts y Bliss (1986) citados por Koenig y Gepts (1989) sugieren que esta zona geográfica es un centro de origen y domesticación así como un punto geográfico de reunión de las formas cultivadas de Mesoamérica y los Andes. Mediante el análisis con marcadores genéticos se sugiere que las especies silvestres del norte Andino han sido domesticadas por separado y ofrecen la posibilidad de que existan alelos únicos en accesiones criollas de dicha región (Koenig y Gepts, 1989).

### **2.1.3 Razas y clases comerciales de *P. vulgaris* L.**

Las variedades de *P. vulgaris* actualmente cultivadas son resultado de un proceso de domesticación y evolución a causa de los fenómenos que rompen el equilibrio genético de la población (mutación, selección, migración y deriva genética) a partir de formas silvestres, en las que se han producido cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos como respuesta a las exigencias humanas, del ambiente o ambos (Gepts y Debouck, 1991). Singh *et al.*, (1991a) dividieron al germoplasma de frijol en dos grupos o acervos y éstos a su vez en seis razas de acuerdo con datos morfológicos-agronómicos, moleculares, distribución geográfica y ecológica, pero Chacón *et al.* (2005) añadieron la raza Guatemalteca al acervo Mesoamericano con base en el análisis del ADN de cloroplasto. Las variedades de las razas Durango, Mesoamérica y Nueva Granada son cultivadas en todo el mundo; sin embargo, la raza Jalisco sólo se cultiva en los valles de México, la raza Chile se distribuye en las regiones secas y de bajas altitudes en el sur de los Andes y la raza Perú en los valles andinos (Cuadro 1) (Rodrigo-Míguez, 2000; Acosta-Gallegos *et al.*, 2007).

Cuadro 1. Acervo genético, razas y variedades populares de frijol.

| Acervo genético | Raza          | Tamaño de semilla | Tipo de faseolina | Tipo de aloenzima                                    | Tipo de haplotipo de ADNcp | Distribución                            | Variedades distintivas  |
|-----------------|---------------|-------------------|-------------------|--|----------------------------|---|---|
| Andino          | Nueva Granada | Mediana y grande  | T                 | <i>Rbc<sup>100</sup></i> o <i>Me<sup>100</sup></i>   | C                          | Altitudes intermedias de los Andes      | Jalo EEP558, California<br>Dark Red Kidney y Michigan                       |
|                 | Chile         | Mediana           | C, H              | <i>Mdh-1<sup>100</sup></i>                           | C                          | Sur Andino                              | Coscorrón, Blanco Español y Frutilla  |
|                 | Perú          | Mediana y grande  | T, C, H           | <i>Mdh-1<sup>103</sup></i>                           | C, K                       | Tierras altas de Los Andes (>2000 msnm) | Cargamanton, Bolón Bayo y Ñuña Coneja                                       |
| Mesoamericano   | Mesoamérica   | Pequeña           | S, Sb, B          | <i>Me<sup>98</sup></i> o <i>Diap-2<sup>105</sup></i> | K, L, I, J                 | Tierras bajas de Latinoamérica          | Jamapa, ICA Pijao, Carioca, Black Turtle Soup, Vista, Tío Canela            |
|                 | Durango       | Mediana           | S, Sd             | <i>Me<sup>102</sup></i>                              | K, L, J                    | Tierras altas semiáridas de México      | Maverick, Sierra, Pinto Villa y Bayo Blanco                                 |
|                 | Jalisco       | Mediana           | S                 | <i>Me<sup>100</sup></i> o <i>Mdh-2<sup>102</sup></i> | K, L                       | Tierras altas húmedas de México         | Garbancillo Zarco, Rosa de Castilla, Flor de Junio Marcela y Negro San Luis |
|                 | Guatemala     | -                 | S                 | -  | I                          | -                                       | Colorado de Teopisca y Bolonillo  |

De acuerdo con Singh *et al.* (1991a); Chacón *et al.* (2005); Acosta-Gallegos *et al.* (2007)

## **2.3 Tipos de frijoles y su relación genética**

### **2.3.1 Frijol silvestre**

La especie *P. vulgaris* var. *aborigineus* se ha utilizado como alimento, medicina, agente fermentante y forraje por milenios (Nabhan *et al.*, 1986). Esta variedad se distribuye en México desde el norte de Chihuahua hasta el sur del estado de Chiapas, a lo largo de la Sierra Madre Oriental y el Eje Neovolcánico. La variedad silvestre muestra los cuatro hábitos de crecimiento, pero predominan los de tipo indeterminado; con hipocotílo color rosa o morado; el número de ramas en el tallo principal promedio es 7.2; flores color morado, que surgen a los 43 días y finalizan a los 75 días (García *et al.*, 1997). La madurez fisiológica se alcanzan a los 113 días y el número de vainas por planta promedio es de 55.4; éstas son de color morado con gran cantidad de fibra tanto en la pared como en la zona de sutura, lo que facilita la dispersión de la semilla en el momento de la maduración del fruto. Las semillas son numerosas y planas, en ocasiones angulares y de tamaño variable según las condiciones ecológicas, pero por lo general muestran 6.7 a 8.5 mm de longitud, de 4.7 a 6 mm de largo y de 2.2 a 3.1 mm de ancho, con un peso de 0.04 a 0.11 g (Babot *et al.*, 2007). También poseen tegumentos duros que retrasan la entrada de la humedad, dilatando el proceso de germinación y son muy variables en la forma, color y patrón de moteado, siendo los moteados más comunes son el gris y marrón, aunque también los hay amarillo, pardo y negro.

### **2.3.2 Frijol domesticado**

A través del proceso de domesticación las variedades de frijol común se han seleccionado a partir de sus ancestros silvestres por sus características de importancia antropocéntrica (García *et al.*, 1997). *P. vulgaris* L. var. *vulgaris* se distribuye en todas las regiones agrícolas de México; muestra un hábito de crecimiento determinado con hipocotílo color rosa; el número de ramas en el tallo principal es de 4.3; flores color blanco que van de los 51.8 y 78.4 días después de la siembra (García *et al.*, 1997). La madurez fisiológica la alcanzan a los 105.3 días y el número de vainas por planta promedio es de 13.7; éstas son de color crema y no presentan acumulación de fibra en la pared ni en la zona de sutura. Las semillas muestran amplia diversidad de tamaños, formas, colores y patrón de

moteado, como consecuencia de las preferencias del consumidor. Las semillas son más permeables al agua comparadas con sus parientes silvestres y presentan grandes dimensiones: 10 a 13 mm de longitud, 7 mm de largo y 5.5 mm de ancho en promedio, con un peso de 0.2 a 0.3 g (Babot *et al.*, 2007); presentan pérdida en la pigmentación, reducción en la dureza de la testa y en el contenido de sustancias tóxicas. Esto probablemente ha generado la mejora en el sabor y causado la pérdida en la protección contra depredadores. Otra diferencia respecto a los genotipos silvestres es que no presentan dormancia, ya que es desfavorable para el agricultor (García *et al.*, 1997).

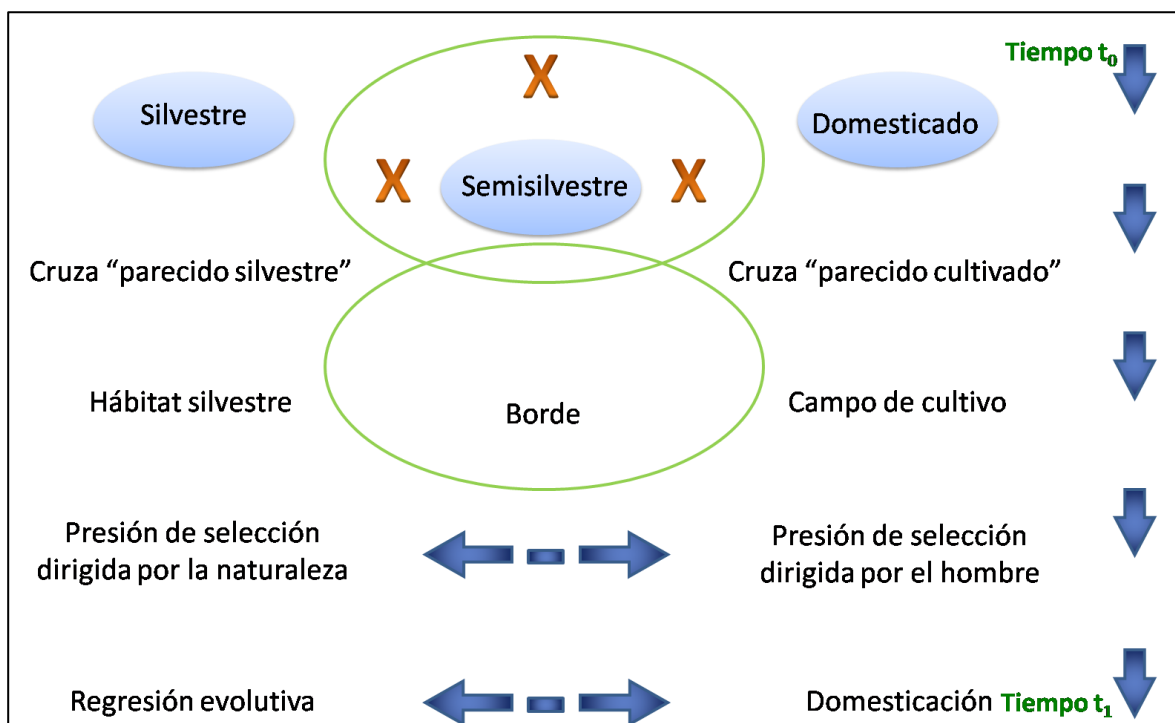
### **2.3.3 Complejo silvestre-semisilvestre-domesticado**

La compatibilidad genética entre poblaciones silvestres y domesticadas conduce a la formación de complejos híbridos de individuos silvestres-semisilvestres-domesticados en sitios con distribución simpátrica por la introgresión de genes de poblaciones silvestres a las domesticadas o viceversa (Payró-de la Cruz *et al.*, 2005). Estos complejos son un mecanismo importante para la generación de variabilidad genética en una especie determinada. Para el caso de *P. vulgaris* L. los complejos híbridos se han observado tanto en la zona Andina como en la Mesoamericana (Beebe *et al.*, 1997; Payró-de la Cruz *et al.*, 2005). A pesar de que el frijol común es una especie generalmente autógena se han encontrado tasas de polinización cruzada entre individuos cercanos a 78 % (Ibarra-Pérez *et al.*, 1997); sin embargo, incluso tasas de polinización bajas (0.07 a 8.26 %) son suficientes para generar amplia variabilidad genética a través de cientos o miles de años (Adams y Martin, 1988; Triana *et al.*, 1993). La polinización cruzada se lleva a cabo de manera natural entre individuos silvestres, semisilvestres y/o cultivados generando varios componentes biológicos en un complejo (Fig. 1).

Los tipos semisilvestres de frijol común surgen de la cruce de formas silvestres por domesticadas, mismos que son ampliamente variables en cuanto a sus características y se generan en repetidas ocasiones a través del tiempo, contribuyendo de esta manera en la generación de diversidad genética. Debido a que son el resultado de la introgresión, éstos individuos usualmente muestran rasgos pertenecientes a ambos progenitores tales como semillas grandes típicas de las domesticadas y patrón de moteado junto con el color de la semilla típicos de las silvestres. Las formas semisilvestres pueden evolucionar hacia la



forma silvestre bajo selección natural, proceso conocido como regresión o forma cultivada, derivada de la presión de selección ejercida por el hombre (Beebe *et al.*, 1997; Payró-de la Cruz *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Diagrama que representa al complejo silvestre-semisilvestre-domesticado en un ambiente natural modificado, donde las cruces se originan en todas direcciones. Los círculos se refieren a poblaciones semisilvestres que se originan a través del tiempo (Adaptado de Beebe *et al.*, 1997).

Una cuestión esencial respecto al complejo es que es explotado por los campesinos que practican la agricultura de subsistencia en donde muchos tipos semisilvestres son cultivados y consumidos junto con los domesticados, conduciendo a la preservación del mismo. Además también representa una fuente valiosa de genes de importancia agrícola para los mejoradores de plantas, ya que los agricultores afirman que los frijoles semisilvestres son más tolerantes a la sequía y al ataque de hongos respecto a los domesticados (Beebe *et al.*, 1997; Payró-Cruz *et al.*, 2005). Sin embargo, algunos agricultores han optado por dirigir su producción hacia el mercado local más que para el autoconsumo, trayendo como consecuencia un alto grado de uniformidad en los tipos de

frijol que se cultivan y a su vez poniendo en riesgo la perpetuación del complejo y la diversidad generada por el mismo. Debido a lo anterior se ha hecho hincapié en la necesidad de proteger estos recursos fitogenéticos mediante programas de conservación *in situ* (sistemas de agricultura tradicional) y *ex situ* (bancos de germoplasma).

## **2.4 Recursos fitogenéticos**

Los recursos fitogenéticos son la suma de todas las combinaciones de genes resultantes de la evolución de una especie. Comprenden desde especies silvestres con potencial agrícola hasta genes clonados (Hidalgo, 1991). El germoplasma tiene o puede tener valor económico o utilitario, actual o futuro, siendo especialmente importante el que contribuye a la seguridad alimentaria (IBPGR, 1991). En tanto le son útiles, el hombre aprovecha los recursos fitogenéticos y para ello debe conocerlos, manejarlos, mantenerlos y utilizarlos racionalmente. Los recursos fitogenéticos constituyen un patrimonio de la humanidad de valor incalculable y su pérdida es un proceso irreversible que supone una grave amenaza para la estabilidad de los ecosistemas, el desarrollo agrícola y la seguridad alimentaria del mundo. Los recursos fitogenéticos son de gran interés en la actualidad debido a que satisfacen necesidades básicas del hombre y ayudan a solucionar problemas severos como el hambre y la pobreza (FAO, 1996). El hombre necesita de cultivos con altos rendimientos y calidad y que se adapten a las condiciones ambientales y resistan las plagas y las enfermedades. Los programas de mejora genética vegetal tienen como fin obtener genotipos vegetales que satisfagan las necesidades humanas y sean productivos, resistentes y de alta calidad. Por ello, es necesario partir de variabilidad genética suficiente para seleccionar aquellas variedades con las características adecuadas según el objetivo del programa de mejora. Para ello son vitales los recursos fitogenéticos que proporcionan la materia prima o genes, que debidamente utilizados y combinados por los mejoradores vegetales, originarán mejores variedades de plantas (Rodrigo-Míguez, 2000). Una fuente de variabilidad genética se puede encontrar en las variedades locales asociadas a la agricultura tradicional o bien en las variedades silvestres estrechamente relacionadas con las cultivadas.

### 2.4.1 Conservación

La pérdida de los recursos fitogenéticos se denomina erosión genética. Durante los últimos años el aumento de la población humana, la industrialización, la migración de la mano de obra agrícola hacia la industria, la extensión de las fronteras agrícolas y la separación entre los centros de producción y de consumo contribuyen a la erosión genética (Jaramillo y Baena, 2000). A ello se suman la adopción de germoplasma élite y la modificación y/o destrucción de los centros de variabilidad genética pudiendo llevar a la extinción del material genético con valor incalculable. Esta pérdida de recursos fitogenéticos evidencia la urgente necesidad de recolección, conservación y uso de manera sostenible (Jaramillo y Baena, 2000; Rodrigo-Míguez, 2000). Las plantas se conservan dependiendo de su necesidad y/o utilidad actuales y futuras. Los recursos fitogenéticos se pueden conservar en su hábitat natural (*in situ*), en condiciones diferentes a las de su hábitat natural (*ex situ*), o combinando ambas condiciones. La selección de uno o varios métodos depende de las necesidades, las posibilidades y la especie objetivo (Jaramillo y Baena, 2000). La conservación *ex situ* es complementaria a la conservación *in situ* dado que no es posible conservar *ex situ* todas las especies. Tradicionalmente se han conservado *ex situ* las especies útiles para la alimentación y la agricultura, cuya conservación exige seguridad y disponibilidad inmediata y futura, tales como especies silvestres y formas regresivas (Frankel *et al.*, 1995), variedades de agricultura tradicional, productos de los programas científicos de mejoramiento, productos de biotecnología y de ingeniería genética (Rao y Riley, 1994; Frankel *et al.*, 1995; FAO, 1996).

Las muestras de una especie se agrupan en una colección, cuyo manejo está a cargo de una institución. El Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI) posee un directorio central de variedades de frijol a través del cual canaliza la información de los bancos de germoplasma en centros de más de 70 países. Dentro de las colecciones de germoplasma del género *Phaseolus* destaca la del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) de Cali, Colombia donde se conserva la colección mundial de frijol con más de 40,000 accesiones de 35 especies (Voyses, 2000). Otros bancos de germoplasma de frijol de relevancia mundial son el Western Regional Plant Introduction Station (Pullman, Washington, EUA) con 8000 accesiones y el Banco de Germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas, y Pecuarias (INIFAP) en México (Vargas-

Vázquez *et al.*, 2006).

Las colecciones de germoplasma son congregaciones de accesiones representativas de una variación genética objetivo de conservación y/o utilización. Pueden contener desde decenas hasta miles de muestras, mantenidas en los ambientes y condiciones relevantes. Las colecciones de germoplasma se clasifican en colección base, activa, núcleo y de trabajo (Jaramillo y Baena, 2000). La colección núcleo reúne la mayor diversidad genética (del 70 al 80 %) de una especie en el menor número de muestras. La colección núcleo se establece para facilitar el manejo y fomentar la utilización del germoplasma. Permite detectar duplicados en la colección base y establecer prioridades para caracterizar y evaluar las muestras; además, ofrece fácil acceso a los materiales conservados (Frankel *et al.*, 1995). Por lo general las colecciones núcleo están a cargo de centros internacionales, programas nacionales o programas colaborativos de cultivos específicos. Algunos ejemplos son la colección núcleo de papa en el INTA (Argentina) y el IBTA (Bolivia); las de yuca y papa en el CENARGEN (Brasil); las de papa y batata en el CNPH (Brasil) y la de yuca en el CIAT (Colombia). En el caso del género *Phaseolus*, destacan la colección núcleo del CIAT (Colombia) y del INIFAP (México) (Vargas-Vázquez *et al.*, 2006).

#### **2.4.2 Caracterización y evaluación del germoplasma**

Los recursos fitogenéticos se conservan para utilizarlos y ello sólo es posible si se conocen sus características y posibles usos. La caracterización y evaluación consisten en describir los atributos cualitativos y cuantitativos de las accesiones de una misma especie para diferenciarlas, determinar su utilidad, estructura, variabilidad y relación genética, y aun localizar los genes que estimulen su uso en la producción o en el mejoramiento de cultivos (Jaramillo y Baena, 2000). La habilidad para identificar la variación genética es indispensable para el uso y manejo efectivo de los recursos genéticos.

#### **Marcadores fenotípicos**

Tradicionalmente, la caracterización del germoplasma consistía en la descripción sistemática de rasgos fenotípicos de las accesiones de una especie tales como el hábito de crecimiento, la altura de la planta y el color de las flores; características que son de alta heredabilidad y no varían por efecto del ambiente (Jaramillo y Baena, 2000; Kameswara-

Rao, 2004). Ocasionalmente, sin embargo, las inferencias basadas en el fenotipo son erróneas, ya que las plantas pueden surgir de diferentes episodios de selección conduciendo a un mismo fenotipo (evolución convergente). Por otra parte, dos fenotipos similares pueden tener una base genética distinta. En ambos casos, la inferencia sobre la relación genética podría no ser la idónea. Una limitante más en el uso de los rasgos fenotípicos es el tiempo requerido para la colecta de datos, que es prolongado (Gepts, 1999).

### **Marcadores bioquímicos**

Los marcadores bioquímicos proporcionan información con mayor rapidez y una de las primeras metodologías fue la electroforesis de proteínas de la semilla y las isoenzimas; técnicas que proveen información útil sobre la diversidad genética y revelan diferencias en el tipo de proteínas que se almacenan en la semilla y sobre las enzimas codificadas por diferentes alelos (aloenzimas) o uno o más *loci* (isoenzimas) (Gepts, 1999; Becerra y Paredes, 2000; Kameswara-Rao, 2004). Sin embargo, su utilización es limitada debido a su incapacidad para detectar los bajos niveles de variación y la sensibilidad ambiental. En frijol los marcadores bioquímicos se han dirigido a la determinación de los tipos de faseolinas, lecitinas e inhibidores de  $\alpha$ -amilosa (proteínas de reserva de la semilla) (Singh *et al.*, 1991a; Singh *et al.*, 1991b; Islam *et al.*, 2001)

### **Marcadores moleculares**

Actualmente, los avances en biología molecular han incorporado nuevos marcadores basados en la secuencia nucleotídica. Un marcador molecular se define como un segmento concreto de ADN representativo de las diferencias a nivel del genoma, que puede estar correlacionado o no con la expresión de algún rasgo fenotípico. Algunas ventajas de los marcadores moleculares respecto a lo fenotípicos es que son estables y detectables en todos los tejidos a pesar del crecimiento, diferenciación, desarrollo, estado de defensa de la célula y además, no ser influenciados por el ambiente, efectos epistémicos o pleiotrópicos (Agarwal *et al.*, 2008). Un marcador molecular ideal debe ser polimórfico y distribuirse a través de todo el genoma, proveer una resolución adecuada de las diferencias genéticas, generar múltiples marcadores, independientes y reproducibles; simple, rápido y económico; necesitar pequeñas cantidades de ADN, estar ligado a distintos fenotipos y no

requerir un conocimiento previo sobre el genoma del organismo (Becerra y Paredes, 2000; Jiménez y Collada, 2000; Agarwal *et al.*, 2008). Los marcadores moleculares tienen diferentes características en cuanto a su tipo de herencia y dominancia; por lo tanto, la elección de los mismos debe hacerse pensando en la información que se desee obtener. En este sentido, al elegir la técnica a utilizar se tomará en cuenta si proporciona un marcador dominante o codominante; si usa ADN nuclear, cloroplástico o mitocondrial; etc. (Jiménez y Collada, 2000).

Los marcadores moleculares pueden clasificarse en dos categorías: las técnicas basadas en la hibridación y los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Un ejemplo de los primeros son los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Debido a la gran cantidad de tiempo requerido, reactivos costosos y tóxico-radioactivos, la gran cantidad de ADN genómico de alta calidad y la necesidad de un conocimiento previo de la secuencia para generar la sonda e incrementar la complejidad de la metodología, los RFLPs son poco usados. Estas limitantes fueron las que condujeron a la conceptualización de un nuevo conjunto de técnicas basadas en la PCR (Kameswara-Rao, 2004; Agarwal *et al.*, 2008) que pueden dividirse en aquellas que utilizan oligonucleótidos arbitrarios como los Polimorfismos del ADN Amplificados al Azar (RAPDs) y Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLPs); y aquéllos que utilizan oligonucleótidos específicos como las Repeticiones de Secuencias Simples (SSRs) y los Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) (Kameswara-Rao, 2004; Agarwal *et al.*, 2008).

Los avances en las técnicas y los descubrimientos basados en el genoma han conducido a una nueva generación de marcadores moleculares. Los nuevos métodos incorporan modificaciones de las técnicas básicas y han incrementado la sensibilidad y capacidad de resolución para detectar la discontinuidad genética y el carácter distintivo (Agarwal *et al.*, 2008). Dentro de los nuevos métodos tenemos a las Secuencias Amplificadas de Regiones Caracterizadas (SCARs) (Paran y Michelmore, 1993; McDermott *et al.*, 1994), Polimorfismo de los Microsatélites Amplificados al Azar (RAMPs) (Wu *et al.*, 1994), Polimorfismos Amplificados de Secuencias Relacionadas (SRAPs) (Li y Quirós, 2001), por citar algunas. Las técnicas antes mencionadas se han aplicado para establecer el centro de origen, domesticación y diversidad de *Phaseolus*,

además de establecer relaciones genéticas entre germoplasma de distintos acervos y búsqueda de genes de interés económico.

### **Marcadores AFLP**

Debido a la limitante de la reproducibilidad asociada con los RAPDs, la tecnología de los AFLPs fue desarrollada (Vos *et al.*, 1995). Esta combina el poder del RFLP con la flexibilidad de la tecnología basada en la PCR por el ligamiento de oligonucleótidos con secuencias de reconocimiento (adaptadores) para la restricción del ADN y una amplificación selectiva por PCR de los fragmentos de restricción usando un conjunto limitado de oligonucleótidos. El primer par de iniciadores usado en el AFLP generalmente produce de 50 a 100 bandas por ensayo. El número de amplicones por ensayo de AFLP está en función del número de nucleótidos selectivos en la combinación de iniciadores AFLP, el motivo del nucleótido selectivo, el contenido de GC, el tamaño físico y complejidad del genoma. La técnica AFLP genera una huella genética respecto a su fuente y sin un conocimiento previo de la secuencia del ADN. La mayoría de los fragmentos del AFLP corresponden a una posición única en el genoma y, por lo tanto, pueden ser utilizados como marcadores en el mapeo físico y genético. La técnica puede usarse para distinguir relaciones estrechas en individuos a nivel de subespecie y para el mapeo de genes (Athoff *et al.*, 2007). La aplicación del AFLP en el mapeo en plantas incluye establecer grupos de ligamiento en cruza, saturar regiones del genoma con marcadores para ubicar el gen deseado y la evaluación del grado de relación o variabilidad entre variedades (Yin *et al.*, 1999; Mian *et al.*, 2002).

### **Marcadores SCAR**

Para utilizar los marcadores identificados por análisis con marcadores arbitrarios (RAPDs o AFLPs) en el mapeo basado en clonación, un *locus* debe identificarse inequívocamente. Además, las técnicas de marcadores arbitrarios son sensibles a cambios en las condiciones de reacción. Para cubrir las expectativas relacionadas con la habilidad de obtener un marcador de ligamiento de un gen de interés en corto tiempo y el uso posterior de estos marcadores en el mapeo basado en la clonación y otros procedimientos de selección, la técnica de los SCARs fue desarrollada y aplicada. Los SCARs son marcadores

basados en la PCR que representan un fragmento de ADN genómico y que genéticamente definen un *locus* amplificado por PCR mediante secuencias de oligonucleótidos específicos (Paran y Michelmore, 1993; McDermott *et al.*, 1994). La derivación de SCAR involucra la clonación del producto amplificado con técnicas de marcadores arbitrarios y la secuenciación de los dos extremos del producto clonado. Las secuencias son posteriormente utilizadas para diseñar un par de oligonucleótidos específicos de 15 a 30 pb los cuales amplifican una banda de tamaño similar al fragmento clonado. Los polimorfismos son registrados como presencia o ausencia de amplificación de la banda o puede aparecer como polimorfismo en la longitud de un marcador de *locus* dominante a un codominante. Como los SCARs primeramente son definidos genéticamente se pueden utilizar tanto como marcadores físicos como genéticos en el genoma. Los SCARs codominantes son más informativos para el mapeo genético que los dominantes y pueden usarse para seleccionar grupos de individuos de una biblioteca genómica por PCR y mapeo físico, definir un *locus* específico; para mapeo comparativo y en estudios de homología entre especies relacionadas (Paran y Michelmore, 1993; Chelkowski y Stephen, 2001; Guo *et al.*, 2003).

#### **2.4.3 Caracterización de colecciones núcleo de *Phaseolus***

La colección núcleo de frijol de la Península Ibérica que pertenece al Grupo de Mejoramiento de Leguminosas de la Misión Biológica de Galicia y el Consejo Español de Investigación Científica (MBG-CSIC) fue caracterizada mediante rasgos morfológicos-agronómicos y por su patrón de faseolinas mediante SDS-PAGE (Rodiño *et al.*, 2003). Brick *et al.* (2006) caracterizaron la colección núcleo del Centro y Sudamérica de frijol resguardada por la USDA/ARS Western Regional Plant Introduction Station de EUA e identificaron nuevas fuentes de resistencia a tres razas del hongo *Fusarium oxysporum*, para lo cual se caracterizaron mediante SCARs desarrollados por Fall (2001) y evaluando su índice promedio de susceptibilidad (ASI) en campo. Ellos observaron que todas las accesiones resistentes contra las tres razas del hongo pertenecían al acervo Mesoamericano y que existía correlación con la amplificación de los SCARs asociados con la resistencia a *F. oxysporum*.



### III. JUSTIFICACIÓN

México es centro de origen, domesticación y diversidad de plantas de importancia agrícola mundial tales como el frijol común. Aunado a esto, el alto valor nutrimental de su grano como fuente de proteína para la alimentación del pueblo mexicano, lo ha consolidado como un cultivo básico del país. Con base en lo anterior México constituye un área geográfica importante para la recolección, conservación y manejo de germoplasma de frijol. Para ello en nuestro país el INIFAP se ha encargado del desarrollo e implementación de programas de conservación y manejo de recursos genéticos basados en el conocimiento de su diversidad tanto de formas silvestres como cultivadas, y ello solo se ha logrado a través de la caracterización y evaluación del germoplasma colectado. La caracterización tradicional del germoplasma de frijol se basa en rasgos morfológicos de alta heredabilidad, pero debido a las limitantes de los mismos se ha optado por la caracterización molecular en los últimos años. La caracterización molecular nos ofrece la mejor alternativa para el conocimiento sobre la diversidad genética de *P. vulgaris*, lo que nos permitirá entender los patrones de variación genética, conocer, mejorar el conocimiento de la riqueza y el potencial genético de accesiones resguardadas en los bancos de germoplasma, todo ello con la finalidad de identificar y proponer a los programas de mejoramiento del cultivo aquellos individuos que podrían aportar características deseables para la producción de nuevo germoplasma mejorado. Específicamente, el conocimiento de la diversidad genética del frijol común proporcionará una mejor visión tanto para su conservación como para un manejo y aprovechamiento en su calidad de recurso fitogenético nativo.

## IV. OBJETIVOS

### **Objetivo general:**

Caracterizar la diversidad y las relaciones genéticas del germoplasma de frijol común de la colección inédita (silvestres x cultivadas) del INIFAP de México y su utilidad en el mejoramiento genético de *Phaseolus*.

### **Objetivos específicos:**

- i. Caracterizar, con base en marcadores moleculares, las accesiones de frijol común de la colección inédita de *Phaseolus vulgaris* L (silvestres x cultivadas) del INIFAP e identificar sus relaciones genéticas.
- ii. Definir la utilidad potencial de la colección inédita de *Phaseolus vulgaris* L. en el mejoramiento genético del frijol común mediante la detección molecular de genes de resistencia a enfermedades de importancia nacional.

## V. HIPÓTESIS

- i. Existen patrones genéticos diferentes y definidos en el germoplasma de frijol, con base en el origen genético y geográfico del mismo.
- ii. La variabilidad genotípica del frijol es significativa y existen estructuras genéticas definidas entre las poblaciones estudiadas.
- iii. Existen genotipos de *P. vulgaris* L. que podrían utilizarse como nuevas fuentes de resistencia a enfermedades en frijol común.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, en Reynosa, Tamaulipas, México.

### 6.1 Material genético

Las accesiones de *P. vulgaris* que se utilizaron (Cuadro 2) son resultado de la cruce aleatoria de germoplasma silvestres x cultivados en diferentes sitios de México. Las accesiones fueron colectadas, son regeneradas y mantenidas en condiciones controladas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Valle de México de Chapingo, México.

Cuadro 2. Origen geográfico del germoplasma que compone la colección inédita de *P.vulgaris* L.

| Número | Entidad    | Altitud (msnm) | Número de accesiones |
|--------|------------|----------------|----------------------|
| 01     | Morelos    | 0905-2550      | 36                   |
| 02     | Jalisco    | 0860-2160      | 46                   |
| 03     | Querétaro  | 1110-2400      | 12                   |
| 04     | Nayarit    | 0995-1140      | 07                   |
| 05     | Oaxaca     | 1540-1880      | 11                   |
| 06     | Guanajuato | 1700-2220      | 13                   |
| 07     | Tlaxcala   | 2180-2300      | 05                   |
| 08     | México     | 1620-1820      | 08                   |
| 09     | Guerrero   | 1100-1900      | 19                   |
| 10     | Durango    | 1480-1940      | 11                   |
| 11     | Chiapas    | 1740-2300      | 07                   |
| 12     | Michoacán  | 1800-2200      | 07                   |
| 13     | Sinaloa    | 2300-1920      | 02                   |
| 14     | Veracruz   | 1000-1560      | 04                   |
| 15     | Puebla     | 1780-2160      | 05                   |
| 16     | Tamaulipas | 1160-1700      | 07                   |
|        | Total      |                | 200                  |

## 6.2 Análisis morfológico

El análisis morfológico del germoplasma se realizó con base en 13 descriptores tanto cualitativos como cuantitativos (IBPGR, 1982) (Cuadro 3)

Cuadro 3. **Descriptores morfológicos cualitativos y cuantitativos evaluados en la colección inédita de *P. vulgaris* L.**

| Descriptor                                     | Escala de medición   |
|--|--|
|  | <b>Cualitativos</b>  |
| Color primario de la cubierta de la semilla    | Negro= 1, Café= 2, Marrón= 3, Gris café a verdoso= 4, Amarillo a amarillo verdoso= 5<br>Crema= 6, Blanco puro= 7, Blancuzco= 8, Blanco coloreado de orado= 9, Verde clorofila= 10, Verde oliva= 11, Rojo= 12, Rosa= 13, Morado= 14 y Bicolor= 15 |
| Color secundario de la cubierta de la semilla  | Se utilizó la misma clasificación que la del color primario.   |
| Brillantez de la semilla                       | Mate= 3, Medio= 5 y Brillante= 7   |
| Patrón de moteado de la cubierta de la semilla | Ausente= 0, Uniforme= 1, Rayas= 2, Manchas romboideas= 3, Puntitos salpicados= 4, Circular= 5, Patrón de color marginal= 6, Tiras anchas= 7, Bicolor= 8, Manchas bicolores= 9, Patron alrededor del hilio= 10 y Otros= 11                        |
| Venación de la semilla                         | Sin venación= 0 y Con venación= 1  |
| Color de cotiledón                             | Morado= 1, Verde= 2 y Otro (rosa)= 3   |
| Color del hipocotilo                           | Morado= 1, Verde= 2 y Otro (rosa)= 3   |
| Forma de la semilla                            | Redonda= 1, Oval= 2, Cuboide= 3, Arriñonada= 4 y Truncada= 5   |
|  | <b>Cuantitativos</b>   |
| Días a emergencia                              | días   |
| Días a etapa V2                                | días   |
| Longitud del folíolo central                   | centímetros  |
| Ancho del foliolo central                      | centímetros  |

## 6.3 Análisis genético

### 6.3.1 Aislamiento del ADN genómico

Para la extracción del ADN genómico se utilizó el método descrito por Saghai-Marooif *et al.* (1984) para 130 muestras, debido a la dificultad que presentaron algunas accesiones en el aislamiento del ADN genómico (49) se utilizó el estuche comercial Wizard<sup>®</sup> Genomic de Promega<sup>®</sup> (Madison, EUA).

**Método de Saghai-Marooif *et al.* (1984).** Se tomó 0.3 g de tejido y se maceró en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, mismo que se colocó en tubos eppendorf que contenían 1 mL del amortiguador de extracción (Tris-HCl 100 mM; EDTA 50 mM; NaCl 700 mM; CTAB -bromuro de cetil-trimetil-amonio- 0.1 %;  $\beta$ -mercaptoetanol 140 mM). Se incubó a 65 °C durante 60 min con agitación suave. Las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se colocó en un tubo eppendorf limpio. A cada muestra se adicionó 7  $\mu$ L de RNAsa a una concentración de 7mg mL<sup>-1</sup> y se incubó a 37 °C durante 40 min. Para recuperar la fase acuosa se agregó un volumen de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1 v/v), se mezcló con un agitador tipo vortex y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min. Para la precipitación de los ácidos nucleicos se agregaron 20  $\mu$ L de NaCl y un volumen de isopropanol frío (-20 °C). Las muestras se almacenaron a -20 °C durante 1 h. Posteriormente, los ácidos nucleicos se recuperaron centrifugando a 13,000 rpm durante 10 min y se colocaron en un tubo eppendorf, realizando dos lavados con etanol 70 %. La pastilla se resuspendió en 30  $\mu$ L de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM) 0.1X. La visualización y cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó en un fotodocumentador Kodak Digital Science 1D (Nueva York, EUA).

**Método del estuche comercial Wizard<sup>®</sup> Genomic de Promega<sup>®</sup>.** Se tomó 40 mg de tejido y maceró en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, mismo que se colocó en tubos eppendorf que contenían 0.6  $\mu$ L de solución de lisis nuclear y se agitó en un vortex por 3 s. La mezcla se incubó a 65 °C durante 60 min con agitación suave. A cada muestra se adicionó 3  $\mu$ L de RNAsa y se incubó a 37 °C durante 15 min.

Posteriormente, la muestra se dejó por 5 min a temperatura ambiente. A cada muestra se adicionó 200  $\mu\text{L}$  de precipitación de proteínas, se agitó con un vortex vigorosamente durante 20 s y se centrifugó a 13,000 rpm. Se tomó cuidadosamente el sobrenadante que contenía el ADN, mismo que se transfirió a un tubo eppendorf con 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló vigorosamente hasta observar una masa visible. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente y se decantó el sobrenadante que contenía el ADN cuidadosamente. Se hicieron lavados con 600  $\mu\text{L}$  de etanol 70 %. La pastilla se resuspendió en 70  $\mu\text{L}$  de solución rehidratante para ADN y se incubó a 65 °C durante 1 h. La visualización y cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó en el fotodocumentador Kodak Digital Science 1D.

### **6.3.2 Análisis SCAR**

En el germoplasma de la colección se identificó la presencia o ausencia de marcadores tipo SCAR asociados con la resistencia al tizón común (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) (SAP6, BAC6, SU91, LG5, R7313, y R4865) (Bai, *et al.*, 1997; Pedraza, *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 1999; Miklas *et al.*, 2000) y la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*) (SAS13, SBB14, SAB3 y SH18) (Adam-Blondon *et al.*, 1994; Geffroy *et al.*, 1998, Young *et al.*, 1998; Alzate *et al.*, 2001) (Cuadros 4 y 5). El volumen de reacción fue de 18  $\mu\text{L}$  para cada SCAR mismo que contenía una mezcla de 70 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de ADN genómico; 2  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{M}$ ) de cada iniciador (sentido y antisentido); 1.8  $\mu\text{L}$  de buffer de PCR (10X); 0.6  $\mu\text{L}$  (10mM) de dNTPs y 1 U de Taq DNA polimerasa (Roche®). El programa de amplificación se resume en el Cuadro 3 para cada SCAR. Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 1.0 % y se visualizaron mediante una tinción con Sybr® Gold (Invitrogen; Oregon, EUA) y la exposición a la luz UV. Posteriormente, los geles se fotografiaron y digitalizaron en un fotodocumentador (Kodak Digital Sciences 1D).

### **6.4 Análisis AFLP**

El método AFLP, descrito por Vos *et al.* (1995), consiste básicamente en el corte del ADN genómico y la ligación de adaptadores específicos. Posteriormente, se realiza una

preamplificación y una amplificación selectiva por PCR. Finalmente, los productos amplificados se separan por electroforesis en geles de acrilamida al 6.5 %.

Cuadro 4. Información de los marcadores tipo SCAR asociados con la resistencia a antracnosis y al tizón común analizados en la colección inédita de *P. vulgaris* L.†

| SCAR               | Pb‡  | Secuencia  |
|--------------------|------|--|
| <b>Antracnosis</b> |      |  |
| SAS13              | 0950 | F <sup>§</sup> - CAC GGA CCG AAT AAG CCA CCA ACA<br>R <sup>¶</sup> - CAC GGA CCG AGG ATA CAG TGA AAG |
| SBB14              | 1150 | F - GTG GGA CCT GTT CAA GAA TAA TAC<br>R - GTG GGA CCT GGG TAG TGT AGA AAT                           |
| SAB3               | 0400 | F - TGG CGC ACA CAT AAG TTC TCA CGG<br>R - TGG CGC ACA CCA TCA AAA AAG GTT                           |
| SH18               | 1100 | F - CCA GAA GGA GCT GAT AGT ACT CCA CAA C<br>R - GGT AGG CAC ACT GAT GAA TCT CAT GTT GGG             |
| <b>Tizón común</b> |      |  |
| SAP6               | 0820 | F - GTC ACG TCT CCT TAA TAG TA<br>R - GTC ACG TCT CAA TAG GCA AA                                     |
| BAC6               | 1250 | F - TAG GCG GCG GCG CAC GTT TTG<br>R - TAG GCG GCG GAA GTG GCG GTG                                   |
| SU91               | 0700 | F - CCA CAT CGG TTA ACA TGA GT<br>R - CCA CAT CGG TGT CAA CGT GA                                     |
| LG5                | 0900 | F - GCA GGG TTC GAA GAC ACA CTG G<br>R - GCA GGG TTC GCC CAA TAA CG                                  |
| R7313              | 0700 | F - ATT GTT ATC GTC GAC ACG<br>R - AAT ATT TCT GAT CAC ACG AG  |
| R4865              | 0950 | F - TCC AAA GCC ATT CTA GTT<br>R - CAG CTA CTT TCA AAC TGG G   |

† Adaptado del Bean Improvement Cooperative (2008) [Liga <http://www.bic.msu.edu>]

‡ Pb= Pares de base

§ F= Forward (en español sentido)

¶ R= Reverse (en español antisentido)

Para la digestión, se utilizó una mezcla de reacción de 20 µL que contenía 3 µL de ADN (70 ng µL<sup>-1</sup>); 1.5 µL de endonucleasa *EcoRI* (Roche®) (40 U µL<sup>-1</sup>) 3.5 µL de la enzima *Tru9I* (Roche®) (10 U µL<sup>-1</sup>), 0.5 µL de espermidina (0.5 M) y 2 µL de buffer RL



(Tris-HAC 100 mM; MgAcO 100 mM; NaCl 1.5 M; KAcO 5 mM 0.1; DTT 5 mM) 10X. Las muestras se incubaron en un termociclador Perkin Elmer modelo Gene Amp 9700 (Applied Biosystems®) a 37 °C por 4 h y 70 °C por 15 min. La mezcla de los fragmentos del ADN digerido se colocó en hielo y se realizó la ligación de los adaptadores. La secuencia del adaptador *EcoRI* fue: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'/3'-CTGACGCATGGTTAA-5' y la del adaptador *MseI* fue: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'/3'-TACTCAGGACTCAT-5'. A los tubos que contenían los fragmentos del ADN digerido se adicionó la mezcla de ligación que consistió de 1 µL del adaptador *EcoRI* (5 pmol), 1 µL del adaptador *MseI* (50 pmol), 1 µL de ATP 10 mM, 0.5 µL de buffer RL 10X y 1 µL de T<sub>4</sub> DNA ligasa (Roche®) (1 U µL<sup>-1</sup>) en un volumen total de 10 µL. La reacción de ligación se llevó a cabo en termociclador con dos ciclos de 20 °C por 60 min. que luego se almacenó a -20 °C.

La mezcla de reacción para la preamplificación incluyó 5 µL de la mezcla de ligación a la que se adicionó la mezcla de oligonucleótidos que consistió de 1.5 µL de *EcoRI* + A (5'-AGACTGCGTACCAATTC/A-3') (50 ng µL<sup>-1</sup>) y 1.5 µL de *MseI* + A (5'-GACGATGAGTCCTGAGTAA/A-3') (50 ng µL<sup>-1</sup>) 0.2 µL de la mezcla de dNTPs 10 mM, 2.5 µL de buffer de PCR (Tris-HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub>; KCl 10 mM) 10X y 0.2 µL de enzima *Taq* DNA polimerasa (Roche®) (5 U µL<sup>-1</sup>) en un volumen total de 25 µL. La mezcla se sometió a amplificación por PCR en termociclador con el siguiente programa: 94 °C por 30 s; 56 °C por 60 s y 72 °C por 60 s por 20 ciclos. Se utilizaron nueve combinaciones de oligonucleótidos selectivos (*EcoRI* + 3/*MseI* + 3) de las cuales se seleccionaron las cuatro con mayor número de bandas y nivel de polimorfismos producidos. Las combinaciones de oligonucleótidos para la amplificación selectiva que al final se escogieron fueron: ACA/AGT, ACA/ATG, ACC/ATG y AGG/ATG. La reacción de amplificación por PCR incluyó al oligonucleótido *EcoRI* + 3(5'-GACTGCGTACCAATTC/NNN-3') que fue marcado con fluorescencia IRDye<sup>TM</sup>-800 y *MseI* + 3 (5'-GATGAGTCCTGAGTAA/NNN-3'), variando el iniciador *EcoRI* y *MseI* en cuanto al número y el orden de las bases selectivas. Se tomaron 3 µL del ADN pre-amplificado diluido en TE 0.1X 1:30 para la mezcla de amplificación selectiva. La mezcla se preparó mediante la combinación del oligonucleótido *EcoRI* + 3 y el oligonucleótido *MseI* + 3, ambos con una concentración de 50 ng µL<sup>-1</sup>, así como la mezcla de dNTPs 10 mM; además de *Taq* DNA polimerasa (5 U

$\mu\text{L}^{-1}$ ) y amortiguador para PCR 10 X para obtener un volumen total de 12  $\mu\text{L}$ . Esta mezcla de reacción se sometió al siguiente programa de PCR: 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s y 72 °C por 60 s; esto por 11 ciclos y donde la temperatura de alineamiento se redujo 0.7 °C por cada ciclo y, posteriormente, continuó con el siguiente programa: 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s y 72 °C por 60 s por 23 ciclos. Al terminar la PCR las muestras se colocaron a -20 °C hasta llevar a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida.

**Cuadro 5. Condiciones de amplificación de los marcadores tipo SCAR asociados con la resistencia a antracnosis o tizón común analizados en la colección inédita de *P. vulgaris* L.†**

| SCAR               | Programa de amplificación  |
|--------------------|--|
| <b>Antracnosis</b> |  |
| SAS13              | 34 ciclos de 10 s a 94 °C, 144 s a 72 °C; seguido por 1 ciclo de 5 min a 72 °C   |
| SBB14              | 34 ciclos de 10 s a 94 °C, 40 s a 67 °C y 120s a 72 °C; seguido por 1 ciclo de 5 min a 72 °C                           |
| SAB3               | 1 ciclo de 3 min a 94 °C; 30 ciclos de 10 s a 94 °C, 30 s a 65 °C, 2 min a 72 °C; seguido por 1 ciclo de 5 min a 72 °C |
| SH18               | 34 ciclos de 10 s a 94 °C, 40 s a 62 °C y 120s a 72 °C seguido por 1 ciclo de 5 min a 72 °C                            |
| <b>Tizón común</b> |  |
| SAP6               | 34 ciclos de 10 s a 94 °C, 40 s a 55 °C y 120s a 72 °C; seguido por 1 ciclo de 5 min a 72 °C                           |
| BAC6               | 34 ciclos de 30 s a 92C, 30 s a 72   |
| SU91               | 34 ciclos de 10 s a 94 °C, 40 s a 58 °C y 120 s a 72 °C; seguido por 1 ciclo de 5 min a 72 °C                          |
| LG5                | 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C y 60s a 72 °C; seguido por 1 ciclo de 5 min a 72 °C                            |
| R7313              | 34 ciclos de 10 s a 94 °C, 40 s a 60 °C y 120 s a 72 °C; seguido por 1 ciclo de 5 min a 72 °C                          |
| R4865              | 34 ciclos de 10 s a 94 °C, 40 s a 60 °C y 120s a 72 °C; seguido por 1 ciclo de 5 min a 72 °C                           |

† Adaptado del Bean Improvement Cooperative (2008) [Liga <http://www.bic.msu.edu>]

La separación de los fragmentos amplificados se realizó en un sistema de secuenciación automática IR<sup>2</sup> (modelo 4200-02G; LICOR®; Lincoln, EUA). La preparación del gel se realizó con base en las indicaciones del manual de análisis AFLP LICOR Bioscience®. Previo a la preparación del gel los vidrios del equipo se limpiaron con isopropanol para evitar fluorescencia de fondo. Para la preparación del gel (de 25 x 25 cm de longitud y 0.25 mm de grosor) se realizó una mezcla (25 mL de acrilamida 6.5 %; 200 µL de persulfato de amonio 10 %; 20 µL de TEMED) con reactivos del estuche comercial LICOR y se utilizó un peine normal de 64 pocillos. Una vez preparado, el gel se pre-corió por 25 min con amortiguador TBE 1X (10.7 g de Trizma base, 5.5 g de ácido bórico, 0.82 g de EDTA) a 1500 V. Posteriormente, se cargó 0.7 µL de la mezcla de reacción (producto de PCR + 4 µL de amortiguador de carga AFLP Licor®, desnaturalizados a 94 °C por 5 min) en el gel de poliacrilamida al 6.5 %. Se estimó el tamaño aproximado de las bandas por comparación con el marcador de peso molecular que va de 50 a 700 pb. Los datos AFLP de las muestras marcadas con IRDye<sup>TM</sup>-800 se colectaron del equipo en tiempo real durante la electroforesis. Finalmente, los productos amplificados se analizaron manualmente.

### 6.5 Análisis estadístico

**Datos morfológicos.** Se estimaron las frecuencias relativas de los datos para las variables cualitativas medidas y la media aritmética para las cuantitativas con base en el origen geográfico y la colección total. Con los 12 descriptores morfológicos se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para identificar las variables más explicativas o con mayor poder discriminante en cuanto a la diversidad morfológica del germoplasma. Posteriormente se realizó un análisis de conglomerados con base en el estado de origen y las variables morfológicas utilizando distancias euclidianas y el algoritmo UPGMA (Método de Agrupamiento de Pares no Ponderados con Medias Aritméticas) con el programa STATISTICA versión 7 (StatSoft<sup>TM</sup>, 2004).

**Datos SCAR.** Se estimó la frecuencia relativa de los datos para cada SCAR con base en su origen geográfico.

**Datos AFLP.** Las bandas amplificadas se numeraron de acuerdo con su migración en el gel. La banda con mayor peso se numeró con 1 y así sucesivamente hasta la de menor peso. Se asumió que dos bandas con el mismo peso en muestras diferentes eran iguales. Para cada combinación se calculó el número de bandas amplificadas donde la presencia se denotó con 1 y la ausencia con 0. La matriz binaria se utilizó para estimar los coeficientes de similitud (Nei y Li, 1979) y luego estimar la distancia genética entre genotipos. El agrupamiento de las accesiones se realizó con base en el origen geográfico utilizando el algoritmo UPGMA y dicho agrupamiento fue validado con un análisis de robustez (“bootstrap”) con 1000 repeticiones/permutaciones utilizando el programa Free Tree (Pavlicek *et al.*, 1999). El dendrograma se visualizó con TreeView versión 1.6.6 (Page, 1996).

El análisis de la estructura de las poblaciones de la colección inédita se realizó con el programa STRUCTURE 2.3.2 corrido con un valor de  $K=4$  (número de grupos en los que se dividió la población) admitiendo un modelo de mezcla y 30,000 repeticiones y 300,000 repeticiones durante el análisis (Pritchard *et al.*, 2000). La relación genética entre las accesiones se analizó mediante un análisis de coordenadas principales (ACoP) utilizando el programa STATISTICA versión 7. Los niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones se estimaron mediante el cálculo del promedio de heterocigosidad de acuerdo con el índice de Nei (IN) (Nei, 1978) y el contenido de información polimórfica (CIP) de acuerdo con Powell (IP) (Powell *et al.*, 1996). También se calculó el porcentaje de *loci* polimórficos utilizando el programa Excel versión 2007. Se realizó un análisis de correlación entre los niveles de diversidad genética y el tamaño de la población utilizando los coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ) y de Spearman ( $\rho$ ) con el programa SAS para Windows 9.0.

## VII. RESULTADOS

La colección inédita de *P. vulgaris* L. incluye 200 accesiones y en este trabajo de investigación se utilizaron sólo 187 (93.5 %) para la caracterización morfológica y la búsqueda de marcadores tipo SCAR debido a que algunos genotipos no lograron germinar en invernadero, mientras que para la caracterización molecular se utilizaron 175 accesiones (87.5 %).

### 7.1 Caracterización morfológica

La brillantez, el patrón de moteado, la venación, el color del cotiledón y del hipocotilo presentaron el número mayor de clases fenotípicas mientras que la forma de la semilla exhibió el menor número. El color café de la semilla fue el color primario más representado (31.7 %) mientras que las semillas bicoloreadas exhibieron la proporción más baja (0.5 %). La mayor diversidad en cuanto al color primario se encontró en los estados de Jalisco y Morelos con nueve y ocho clases fenotípicas, mientras que los estados menos diversos fueron Tamaulipas y Sinaloa con tres y dos clases fenotípicas, respectivamente. El 65.7 % del germoplasma no presentó color secundario de la testa de la semilla. Del 34.3 % restante destaca el negro (24.5 %) mientras que los colores marrón, amarillo y rosa mostraron 0.2 % de aparición. El germoplasma de Morelos presentó el mayor número de clases fenotípicas para el color secundario (5) y Veracruz, Durango, Michoacán y Sinaloa los menores (1). La brillantez media de la semilla se observó en 71.6 % del germoplasma y el mate en 2.8 %. Los estados de Morelos, Querétaro, Jalisco, Guerrero y Michoacán presentaron tres clases fenotípicas, mientras que Tamaulipas presentó una (media). Las semillas de la colección inédita de *P. vulgaris* se caracterizaron por la ausencia de patrón de moteado (65.2 %) y las que lo presentaron (34.3 %) exhibieron manchas romboides (17.7 %); los patrones circular, tiras anchas, manchas bicolores y otros fueron los menos frecuentes (0.7 %). En esta variable el estado de Morelos presentó el mayor número de clases fenotípicas (siete) y Durango sólo una. Las semillas también se caracterizaron por la presencia de venación (72.7 %) y forma cúbica (100 %). Las plantas cultivadas en invernadero presentaron en su mayoría cotiledones

verdes (73 %) y sólo el 8.9 % mostró cotiledones rosas. Los estados de Morelos, Querétaro, Tlaxcala, Puebla, Jalisco, Durango, Tamaulipas, Chiapas y Oaxaca registraron tres clases fenotípicas para dicho rasgo, mientras que México presentó una. El color predominante del hipocotilo fue rosa (81.2 %) y el de menor frecuencia morado (0.2 %). El estado de Morelos fue el único que mostró tres clases fenotípicas y Veracruz y Puebla solo una (Cuadros 6 y 7).

**Cuadro 6. Frecuencias relativas de las variables morfológicas cualitativas evaluadas en la colección inédita de *P. vulgaris* L.**

| Variable             |                             | Frecuencia relativa (%) |
|----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Nombre               | Clases fenotípicas          |                         |
| Color primario       | Negro                       | 14.0                    |
|                      | Café                        | 31.7                    |
|                      | Marrón                      | 07.5                    |
|                      | Gris café a verdoso         | 15.6                    |
|                      | Amarillo a amarillo verdoso | 05.4                    |
|                      | Crema                       | 19.6                    |
|                      | Blancuzco                   | 00.7                    |
|                      | Verde oliva                 | 02.3                    |
|                      | Rosa                        | 01.4                    |
|                      | Morado                      | 01.6                    |
| Color secundario     | Bicolor                     | 00.5                    |
|                      | Ninguno                     | 65.7                    |
|                      | Negro                       | 24.5                    |
|                      | Café                        | 04.0                    |
|                      | Marrón                      | 00.2                    |
|                      | Gris café a verdoso         | 02.6                    |
|                      | Amarillo a amarillo verdoso | 00.2                    |
|                      | Crema                       | 02.6                    |
| Rosa                 | 00.2                        |                         |
| Brillantez           | Mate                        | 02.8                    |
|                      | Medio                       | 71.6                    |
|                      | Brillante                   | 25.6                    |
| Patrón de moteado    | Ninguno                     | 65.3                    |
|                      | Uniforme                    | 02.3                    |
|                      | Rayas                       | 06.5                    |
|                      | Manchas romboideas          | 17.7                    |
|                      | Puntitos salpicados         | 02.1                    |
|                      | Circular                    | 00.7                    |
|                      | Patrón de color marginal    | 00.5                    |
|                      | Tiras anchas                | 00.7                    |
|                      | Bicolor                     | 02.8                    |
|                      | Manchas bicolores           | 00.7                    |
| Otros                | 00.7                        |                         |
| Venación             | Sin venación                | 27.3                    |
|                      | Con venación                | 72.7                    |
| Color del cotiledón  | Morado                      | 18.2                    |
|                      | Verde                       | 73.0                    |
|                      | Otro (rosa)                 | 08.9                    |
| Color del hipocotilo | Morado                      | 00.2                    |
|                      | Verde                       | 19.6                    |
|                      | Otro (rosa)                 | 80.2                    |
| Forma de la semilla  | Cúbica                      | 100.0                   |

**Cuadro 7. Frecuencias relativas de las variables morfológicas cualitativas evaluadas en la colección inédita de *P. vulgaris* L. por estados.**

| Estado     | Color primario   |          | Color secundario |        | Brillantez       |        | Patrón de moteado |        | Venación         |        | Color del cotiledón |        | Color del hipocotilo |        |
|------------|------------------|----------|------------------|--------|------------------|--------|-------------------|--------|------------------|--------|---------------------|--------|----------------------|--------|
|            | Clase Fenotípica | FR † (%) | Clase Fenotípica | FR (%) | Clase Fenotípica | FR (%) | Clase fenotípica  | FR (%) | Clase fenotípica | FR (%) | Clase Fenotípica    | FR (%) | Clase fenotípica     | FR (%) |
| Morelos    | 2                | 29.3     | 0                | 68.3   | 3                | 4.9    | 0                 | 67.1   | 0                | 47.6   | 1                   | 11.0   | 1                    | 01.2   |
|            | 6                | 29.3     | 1                | 15.9   | 5                | 52.4   | 3                 | 08.5   | 1                | 52.4   | 2                   | 82.9   | 2                    | 02.4   |
|            | Otros (6) †      | 41.4     | Otros (4)        | 15.8   | 7                | 42.7   | Otros (6)         | 24.4   |                  |        | 3                   | 06.1   | 3                    | 96.4   |
| Nayarit    | 3                | 25.0     | 0                | 50.0   | 3                | 0.0    | 0                 | 41.7   | 0                | 58.3   | 1                   | 33.3   | 1                    | 00.0   |
|            | 6                | 25.0     | 1                | 33.3   | 5                | 58.3   | 1                 | 25.0   | 1                | 41.7   | 2                   | 66.7   | 2                    | 16.7   |
|            | Otros (4)        | 50.0     | Otros (2)        | 16.7   | 7                | 41.7   | Otros (4)         | 33.3   |                  |        | 3                   | 00.0   | 3                    | 83.3   |
| Querétaro  | 2                | 31.6     | 0                | 47.4   | 3                | 5.3    | 0                 | 47.4   | 0                | 47.4   | 1                   | 10.5   | 1                    | 00.0   |
|            | 6                | 31.6     | 1                | 47.4   | 5                | 68.4   | 3                 | 26.3   | 1                | 52.6   | 2                   | 84.2   | 2                    | 31.6   |
|            | Otros (2)        | 36.8     | 4                | 5.3    | 7                | 26.3   | Otros (4)         | 26.3   |                  |        | 3                   | 05.3   | 3                    | 68.4   |
| Tlaxcala   | 1                | 20.0     | 0                | 50.0   | 3                | 0.0    | 0                 | 50.0   | 0                | 30.0   | 1                   | 10.0   | 1                    | 00.0   |
|            | 2                | 20.0     | 1                | 40.0   | 5                | 30.0   | 3                 | 20.0   | 1                | 70.0   | 2                   | 80.0   | 2                    | 20.0   |
|            | Otros (4)        | 60.0     | 2                | 10.0   | 7                | 70.0   | Otros (3)         | 30.0   |                  |        | 3                   | 10.0   | 3                    | 80.0   |
| México     | 4                | 21.1     | 0                | 68.4   | 3                | 0.0    | 0                 | 68.4   | 0                | 10.5   | 1                   | 00.0   | 1                    | 00.0   |
|            | 6                | 21.1     | 1                | 21.1   | 5                | 68.4   | 3                 | 21.1   | 1                | 89.5   | 2                   | 100.0  | 2                    | 21.1   |
|            | Otros (5)        | 57.8     | 6                | 10.5   | 7                | 31.6   | Otros (2)         | 10.5   |                  |        | 3                   | 00.0   | 3                    | 78.9   |
| Veracruz   | 5                | 37.5     | 0                | 50.0   | 3                | 0.0    | 0                 | 50.0   | 0                | 50.0   | 1                   | 12.5   | 1                    | 00.0   |
|            | 4                | 25.0     | 1                | 50.0   | 5                | 62.5   | 2                 | 25.0   | 1                | 50.0   | 2                   | 87.5   | 2                    | 00.0   |
|            | Otros (3)        | 37.5     |                  | 10.0   | 7                | 37.5   | 3                 | 25.0   |                  |        | 3                   | 00.0   | 3                    | 100.0  |
| Puebla     | 2                | 20.0     | 0                | 80.0   | 3                | 0.0    | 0                 | 80.0   | 0                | 10.0   | 1                   | 20.0   | 1                    | 00.0   |
|            | 4                | 20.0     | 1                | 10.0   | 5                | 10.0   | 1                 | 10.0   | 1                | 90.0   | 2                   | 80.0   | 2                    | 00.0   |
|            | Otros (5)        | 60.0     | 4                | 10.0   | 7                | 90.0   | 3                 | 10.0   |                  |        | 3                   | 00.0   | 3                    | 100.0  |
| Jalisco    | 2                | 34.3     | 0                | 76.5   | 3                | 2.0    | 0                 | 75.5   | 0                | 17.6   | 1                   | 14.7   | 1                    | 00.0   |
|            | 6                | 18.6     | 1                | 18.6   | 5                | 70.6   | 3                 | 11.8   | 1                | 82.4   | 2                   | 84.3   | 2                    | 27.5   |
|            | Otros (7)        | 47.1     | Otros (3)        | 4.9    | 7                | 27.4   | Otros (3)         | 12.7   |                  |        | 3                   | 01.0   | 3                    | 72.5   |
| Guerrero   | 1                | 21.1     | 0                | 60.5   | 3                | 7.9    | 0                 | 63.2   | 0                | 31.6   | 1                   | 23.7   | 1                    | 00.0   |
|            | 2                | 36.8     | 1                | 23.7   | 5                | 81.6   | 3                 | 23.7   | 1                | 68.4   | 2                   | 76.3   | 2                    | 13.2   |
|            | Otros (5)        | 42.1     | Otros (3)        | 15.8   | 7                | 10.5   | Otros (5)         | 13.1   |                  |        | 3                   | 00.0   | 3                    | 86.8   |
| Guanajuato | 1                | 25.6     | 0                | 61.5   | 3                | 0.0    | 0                 | 61.5   | 0                | 15.4   | 1                   | 28.2   | 1                    | 00.0   |
|            | 2                | 35.9     | 1                | 25.6   | 5                | 94.9   | 3                 | 15.4   | 1                | 84.6   | 2                   | 71.8   | 2                    | 15.4   |
|            | Otros (5)        | 38.5     | 2                | 12.9   | 7                | 5.1    | Otros (3)         | 23.1   |                  |        | 3                   | 00.0   | 3                    | 84.6   |
| Durango    | 2                | 34.8     | 0                | 78.3   | 3                | 0.0    | 0                 | 78.3   | 0                | 8.7    | 1                   | 26.1   | 1                    | 00.0   |
|            | 11               | 21.7     | 1                | 21.7   | 5                | 95.7   | 3                 | 21.7   | 1                | 91.3   | 2                   | 69.6   | 2                    | 13.0   |
|            | Otros (5)        | 43.5     |                  |        | 7                | 4.3    |                   |        |                  |        | 3                   | 04.3   | 3                    | 87.0   |
| Tamaulipas | 1                | 47.1     | 0                | 58.8   | 3                | 0.0    | 0                 | 58.8   | 0                | 5.9    | 1                   | 11.8   | 1                    | 00.0   |
|            | 2                | 35.3     | 1                | 35.3   | 5                | 100.0  | 3                 | 23.5   | 1                | 94.1   | 2                   | 58.8   | 2                    | 47.1   |
|            | 6                | 17.6     | 2                | 5.9    | 7                | 0.0    | Otros (2)         | 17.7   |                  |        | 3                   | 29.4   | 3                    | 52.9   |
| Chiapas    | 2                | 30.8     | 0                | 46.2   | 3                | 7.7    | 0                 | 46.2   | 0                | 0.0    | 1                   | 15.3   | 1                    | 00.0   |
|            | 4                | 23.1     | 1                | 46.2   | 5                | 92.3   | 1                 | 15.3   | 1                | 100.0  | 2                   | 38.5   | 2                    | 15.4   |
|            | Otros (4)        | 46.1     | 6                | 7.6    | 7                | 0.0    | 3                 | 38.5   |                  |        | 3                   | 46.2   | 3                    | 84.6   |
| Michoacán  | 2                | 29.4     | 0                | 64.7   | 3                | 5.8    | 0                 | 64.7   | 0                | 17.6   | 1                   | 11.8   | 1                    | 00.0   |
|            | 4                | 23.5     | 1                | 35.3   | 5                | 82.4   | 2                 | 05.9   | 1                | 82.4   | 2                   | 35.3   | 2                    | 17.6   |
|            | Otros (4)        | 47.1     |                  |        | 7                | 11.8   | 3                 | 29.4   |                  |        | 3                   | 52.9   | 3                    | 82.4   |
| Sinaloa    | 2                | 33.3     | 0                | 66.7   | 3                | 0.0    | 0                 | 66.7   | 0                | 33.3   | 1                   | 00.0   | 1                    | 00.0   |
|            | 6                | 66.7     | 13               | 33.3   | 5                | 66.7   | 4                 | 33.3   | 1                | 66.7   | 2                   | 33.3   | 2                    | 33.3   |
|            |                  |          |                  |        | 7                | 33.3   |                   |        |                  |        | 3                   | 66.7   | 3                    | 66.7   |
| Oaxaca     | 2                | 42.9     | 0                | 50.0   | 3                | 0.0    | 0                 | 50.0   | 0                | 42.9   | 1                   | 07.1   | 1                    | 00.0   |
|            | 6                | 21.4     | 1                | 28.6   | 5                | 85.7   | 2                 | 07.1   | 1                | 57.1   | 2                   | 64.3   | 2                    | 21.4   |
|            | Otros (4)        | 35.7     | Otros (2)        | 21.4   | 7                | 14.3   | 3                 | 42.9   |                  |        | 3                   | 28.6   | 3                    | 78.6   |

† Número de clases fenotípicas

‡ FR: Frecuencias relativas

El valor numérico mayor para el rango, varianza y desviación estándar se observó en la variable días a la etapa V2 y el menor en el ancho del foliolo central. El CV mayor se observó en los días a emergencia (28.2 %) y el menor para los días a la etapa V2 (20.1 %) (Cuadro 8).

**Cuadro 8. Parámetros estadísticos de las variables cuantitativas evaluadas en la colección inédita de *P. vulgaris* L.**

| Variable                     | Parámetro |       |          |                     |         |
|------------------------------|-----------|-------|----------|---------------------|---------|
|                              | Media     | Rango | Varianza | Desviación Estándar | CV† (%) |
| Días a emergencia            | 5.1       | 09.0  | 2.1      | 1.4                 | 28.2    |
| Días a la etapa V2           | 7.4       | 10.0  | 2.2      | 1.5                 | 20.1    |
| Longitud del foliolo central | 4.0       | 06.0  | 0.8      | 0.9                 | 22.3    |
| Ancho del foliolo central    | 2.0       | 02.7  | 0.2      | 0.5                 | 23.2    |

† CV= Coeficiente de Variación

En el germoplasma de Querétaro se encontraron las semillas que requirieron mayor tiempo para emerger ( $\bar{X} = 6.7$  d) mientras que las semillas de Guanajuato requirieron menor ( $\bar{X} = 4.4$  d). Para los días a la etapa V2 Querétaro mostró el valor mayor ( $\bar{X} = 9.1$  d) y Guerrero el menor ( $\bar{X} = 6.3$  d). Las plantas de frijol de Tlaxcala presentaron el foliolo central más largo ( $\bar{X} = 4.6$  cm) y las de Tamaulipas y Durango los más cortos ( $\bar{X} = 3.4$  cm) mientras que los foliolos centrales más anchos se encontraron en Oaxaca ( $\bar{X} = 2.8$  cm) y los menores en México, Puebla y Durango ( $\bar{X} = 1.8$  cm) (Cuadro 9). El ACP de las variables morfológicas explicó más del 65 % de la variación total observada con los primeros tres CPs. Para el primer CP la presencia de venación fue la característica más descriptiva ( $P \geq 0.7$ ) y para el segundo los días a emergencia y el ancho del foliolo (Cuadros 10 y 11). El análisis de conglomerados con base en todas las variables morfológicas indicó la formación de cuatro grupos genéticos con base en el origen (Fig. 2). El grupo A incluye germoplasma con semillas café pálido a oscuro, brillo medio y con venación; las plántulas emergen a los cinco días y despliegan sus hojas a los ocho; la longitud del foliolo central va de 3.9 a 4.5 cm y el ancho de 1.9 a 2.5 cm. El germoplasma proviene de Morelos, Jalisco, Oaxaca, Querétaro, Chiapas y Michoacán. El grupo B se



caracteriza por incluir frijoles con semillas café-pálido a oscuro, brillo medio y con venación. Las plántulas por lo general emergen a los cuatro días y desplegan totalmente sus hojas a los seis. El foliolo central va de 3.4 a 4.3 cm de largo y de 1.6 a 2 cm de ancho. El germoplasma se colectó en Guerrero, Guanajuato, Durango y Tamaulipas. El grupo C tiene germoplasma con semillas crema, brillo medio y algunas con venación (50 %). Las plántulas emergen a los cuatro días y desplegan sus hojas a los ocho. La longitud del foliolo central va de 3.7 a 3.9 cm y de 1.8 a 2.5 cm de ancho. Aquí se observaron frijoles de Nayarit, México, Sinaloa y Veracruz. El grupo D está conformado por semillas color gris-café a verdoso, brillantes y sin venación; con plántulas que emergen a los cuatro días y desplegan sus hojas a los ocho; la longitud del foliolo central fue de 3.6 a 4.6 cm y de 1.8 a 2.1 cm en ancho; el germoplasma de este grupo proviene de Tlaxcala y Puebla (Fig. 2).

**Cuadro 9. Media aritmética de las variables morfológicas cuantitativas evaluadas en la colección inédita de *P. vulgaris* L. por estados.**

| Estado     | Variable          |                 |                                   |                                |
|------------|-------------------|-----------------|-----------------------------------|--------------------------------|
|            | Días a emergencia | Días a etapa V2 | Longitud del foliolo central (cm) | Ancho del foliolo central (cm) |
| Morelos    | 4.8               | 7.3             | 4.2                               | 2.1                            |
| Nayarit    | 5.4               | 7.8             | 4.4                               | 2.1                            |
| Querétaro  | 5.1               | 7.4             | 3.9                               | 2.0                            |
| Tlaxcala   | 5.6               | 7.4             | 3.7                               | 1.8                            |
| México     | 4.9               | 6.5             | 4.2                               | 2.0                            |
| Veracruz   | 4.9               | 6.3             | 4.6                               | 2.1                            |
| Puebla     | 4.2               | 6.2             | 4.3                               | 2.0                            |
| Jalisco    | 5.1               | 7.5             | 3.8                               | 2.0                            |
| Guerrero   | 5.0               | 7.1             | 3.7                               | 1.9                            |
| Guanajuato | 5.7               | 8.5             | 4.1                               | 2.0                            |
| Durango    | 5.7               | 8.1             | 4.1                               | 2.1                            |
| Tamaulipas | 5.0               | 6.8             | 4.0                               | 1.8                            |
| Chiapas    | 5.2               | 7.1             | 4.0                               | 1.8                            |
| Michoacán  | 5.2               | 7.2             | 3.5                               | 1.9                            |
| Sinaloa    | 4.7               | 6.3             | 4.1                               | 2.4                            |
| Oaxaca     | 4.7               | 7.1             | 4.0                               | 2.0                            |

Cuadro 10. Valores característicos del análisis de componentes principales para las variables morfológicas evaluadas en la colección inédita de *P. vulgaris* L.

| Componente principal | Valor Característico | Valor característico acumulado | Varianza total (%) | Varianza total acumulada (%) |
|----------------------|----------------------|--------------------------------|--------------------|------------------------------|
| 1                    | 2.4                  | 2.4                            | 26.6               | 26.6                         |
| 2                    | 2.3                  | 4.7                            | 25.3               | 51.9                         |
| 3                    | 1.3                  | 6.0                            | 14.5               | 66.4                         |

Cuadro 11. Vectores característicos para las variables morfológicas evaluadas en la colección inédita de *P. vulgaris* L con base en el análisis de componentes principales.

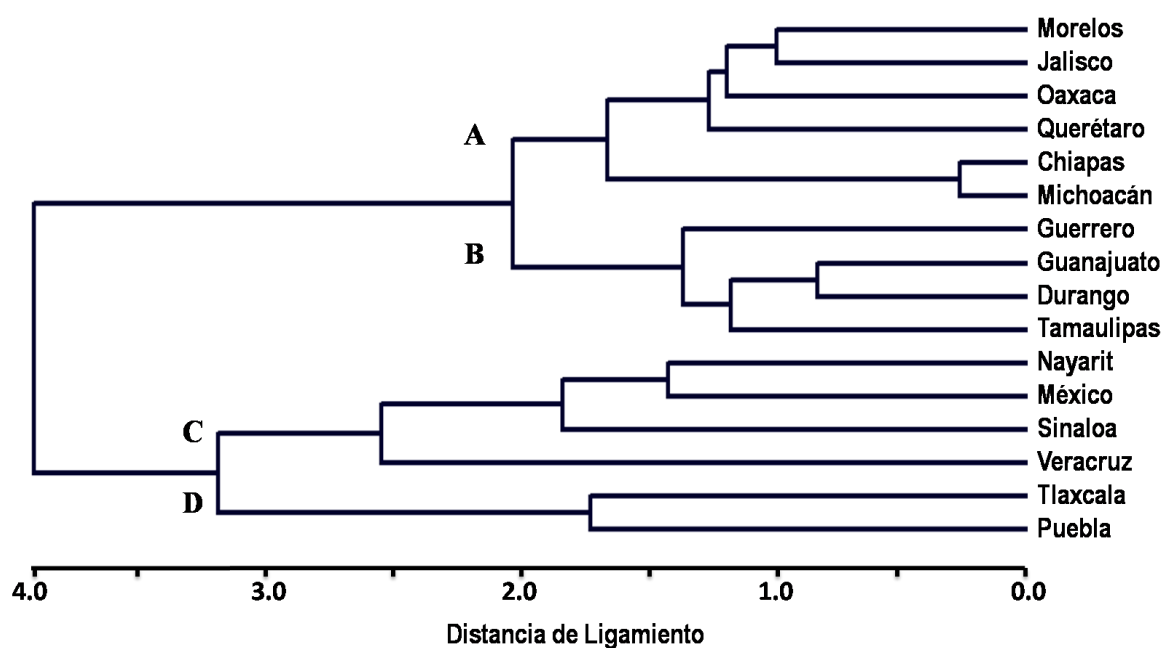
| Variable                     | Componente principal |         |       |
|------------------------------|----------------------|---------|-------|
|                              | 1                    | 2       | 3     |
| Color primario               | -0.54                | -0.17   | -0.65 |
| Color secundario             | -0.63                | -0.36   | 0.45  |
| Brillantez                   | -0.01                | 0.16    | -0.69 |
| Venación                     | 0.76 †               | 0.25    | 0.07  |
| Días a emergencia            | -0.24                | -0.76 † | 0.29  |
| Días a etapa V2              | -0.48                | -0.55   | -0.27 |
| Color del hipocotilo         | 0.45                 | -0.58   | -0.06 |
| Longitud del foliolo central | 0.58                 | -0.48   | -0.12 |
| Ancho del foliolo central    | 0.54                 | -0.76 † | -0.16 |

† Variables más explicativas ( $P > 0.7$ )

## 7.2 Caracterización molecular mediante marcadores SCAR

Siete marcadores SCAR se encontraron en la colección inédita de *P. vulgaris* de los diez evaluados; tres para resistencia a antracnosis SCARs y cuatro para el tizón común. El germoplasma del estado de Morelos fue el único en el que se detectaron los siete marcadores mientras que en el de Veracruz sólo se detectaron tres. De los SCARs asociados con la resistencia a antracnosis SBB14 se encontró con mayor frecuencia (61.5 %) y SAB3 con la menor (21.9 %). El germoplasma de Morelos, Querétaro, Tlaxcala, Puebla, Jalisco, Guerrero, Guanajuato, Durango, Tamaulipas, Chiapas, Sinaloa y Oaxaca muestra tres SCARs asociados con la resistencia a antracnosis y el de Veracruz sólo uno. Para SAS13 se observó polimorfismo dado que amplificó una banda de 950 y otra de 250 pb. Para este marcador, los frijoles de Guanajuato y Tlaxcala mostraron la mayor

frecuencia relativa de amplificación mientras que en el de Veracruz, Chiapas y Sinaloa no se detectó. En el caso de SBB14 se observaron bandas de 1150 y 1250 pb debido a que es codominante. El germoplasma de Tamaulipas y Sinaloa presentó la mayor frecuencia relativa del SCAR y el de Veracruz y México las menores. Por su parte, SAP3 también fue polimórfico ya que amplificó una banda de 450 y otra de 300 pb. Sinaloa y Oaxaca mostraron las mayores frecuencias relativas de accesiones con el SCAR mientras que en el de Nayarit, México, Veracruz y Michoacán no se detectó (Cuadro 12).



**Figura 2.** Dendrograma del germoplasma de la colección inédita de *P. vulgaris* L. con base en el estado de origen y variables morfológicas.

Respecto a los marcadores asociados con la resistencia a tizón común, SAP6 se encontró en mayor proporción (44.9 %) y LG5 en la menor (1.1 %). El germoplasma de Morelos presentó los cuatro SCARs y el de Veracruz y Sinaloa sólo uno. Para BAC6 se observó polimorfismo ya que amplificó bandas de 1250, 1000, 900 y 500 pb. Los frijoles de Tlaxcala mostraron la mayor frecuencia relativa de accesiones con el marcador mientras que las de Sinaloa no lo presentaron. SAP6 es un SCAR polimórfico con bandas de 820 y 500 pb que se presentó en mayor frecuencia en genotipos de Tlaxcala y Guerrero mientras

que México, Veracruz, Chiapas y Sinaloa no presentaron. Por su parte LG5 fue también polimórfico ya que amplificó bandas de 900 y 450 pb. Sólo en los frijoles de Morelos se encontró dicho SCAR. El SCAR R4865 también fue polimórfico (bandas de 950 y de 500 pb). El estado de Sinaloa registró la mayor frecuencia relativa de accesiones con el SCAR mientras que en el de Veracruz no se detectó (Cuadro 12).

**Cuadro 12. Frecuencias relativas de los marcadores tipo SCAR detectados en la colección inédita de *P. vulgaris* L.**

| Estado             | NA <sup>†</sup> | SCAR de resistencia a: |       |      |             |      |      |       | Total <sup>‡</sup> |
|--------------------|-----------------|------------------------|-------|------|-------------|------|------|-------|--------------------|
|                    |                 | Antracnosis            |       |      | Tizón común |      |      |       |                    |
|                    |                 | SAS13                  | SBB14 | SAB3 | BAC6        | SAP6 | LG5  | R4865 |                    |
| Morelos            | 33              | 0.33                   | 0.55  | 0.03 | 0.45        | 0.48 | 0.06 | 0.45  | 078                |
| Nayarit            | 05              | 0.20                   | 0.80  | 0.00 | 0.40        | 0.40 | 0.00 | 0.40  | 011                |
| Querétaro          | 12              | 0.08                   | 0.58  | 0.08 | 0.42        | 0.58 | 0.00 | 0.42  | 026                |
| Tlaxcala           | 05              | 0.60                   | 0.80  | 0.40 | 0.80        | 0.80 | 0.00 | 0.80  | 021                |
| México             | 08              | 0.13                   | 0.25  | 0.00 | 0.13        | 0.00 | 0.00 | 0.13  | 005                |
| Veracruz           | 04              | 0.00                   | 0.25  | 0.00 | 0.25        | 0.00 | 0.00 | 0.00  | 002                |
| Puebla             | 05              | 0.40                   | 0.40  | 0.40 | 0.20        | 0.20 | 0.00 | 0.20  | 009                |
| Jalisco            | 44              | 0.27                   | 0.61  | 0.30 | 0.43        | 0.55 | 0.00 | 0.27  | 107                |
| Guerrero           | 15              | 0.53                   | 0.67  | 0.13 | 0.67        | 0.80 | 0.00 | 0.20  | 045                |
| Guanajuato         | 13              | 0.62                   | 0.77  | 0.46 | 0.69        | 0.69 | 0.00 | 0.62  | 050                |
| Durango            | 10              | 0.10                   | 0.30  | 0.20 | 0.30        | 0.30 | 0.00 | 0.40  | 016                |
| Tamaulipas         | 07              | 0.43                   | 1.00  | 0.43 | 0.29        | 0.29 | 0.00 | 0.57  | 021                |
| Chiapas            | 07              | 0.00                   | 0.71  | 0.43 | 0.14        | 0.00 | 0.00 | 0.57  | 013                |
| Michoacán          | 07              | 0.43                   | 0.71  | 0.00 | 0.57        | 0.14 | 0.00 | 0.71  | 018                |
| Sinaloa            | 02              | 0.00                   | 1.00  | 0.50 | 0.00        | 0.00 | 0.00 | 1.00  | 005                |
| Oaxaca             | 10              | 0.10                   | 0.80  | 0.50 | 0.20        | 0.30 | 0.00 | 0.70  | 026                |
| Total <sup>‡</sup> | 187             | 55                     | 115   | 41   | 78          | 84   | 02   | 77    | 453                |

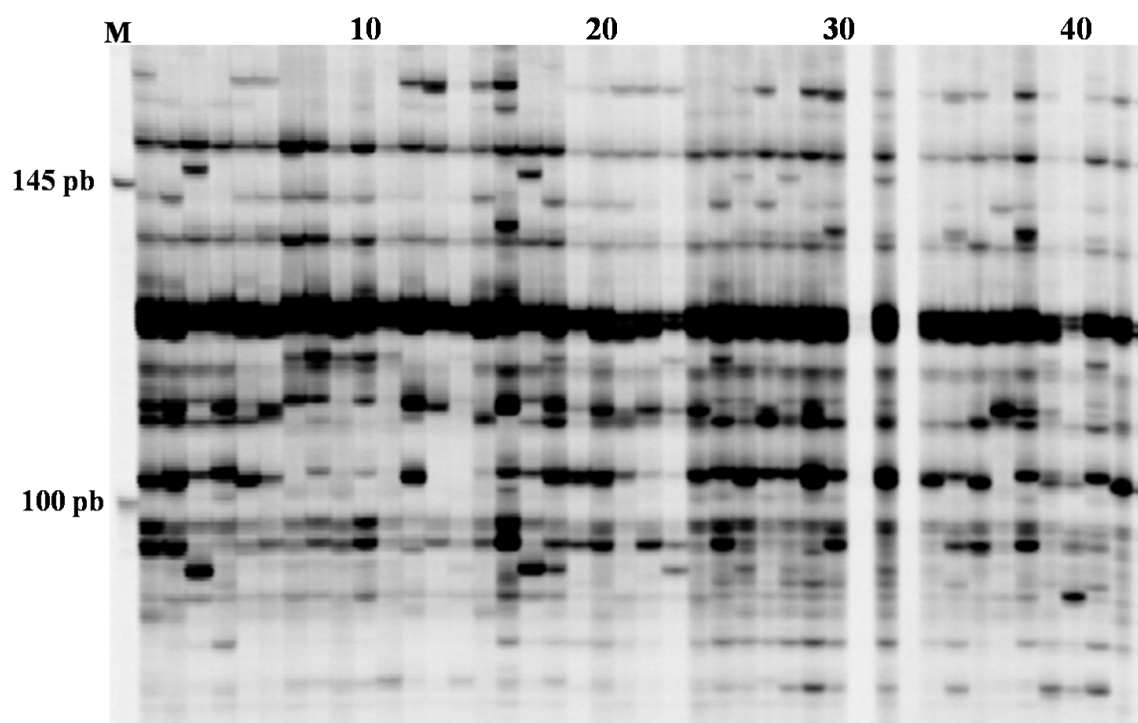
<sup>†</sup> NA= Número de accesiones

<sup>‡</sup> Frecuencias absolutas

### 7.3. Caracterización molecular mediante marcadores AFLP

Las cuatro combinaciones de iniciadores AFLP amplificaron 315 productos de los cuales 301 fueron polimórficos (95.4 %) y 14 monomórficos (4.6 %) (Fig. 3). La

combinación ACA/ATG registró el mayor número de productos amplificados y de bandas monomórficas en el germoplasma. Por otra parte la combinación ACA/AGT reveló el porcentaje de polimorfismo más alto (96.7 %). De acuerdo con el IP la combinación AGG/ATG fue la más informativa y con base en el IN lo fue ACA/AGT (Cuadro 13). El germoplasma de la región geográfica del norte-centro de México registró la mayor diversidad genética y el sur del país la menor con base en el IP, mientras que con el IN las regiones muestran valores similares con excepción del sur que reportó otra vez la menor diversidad (Cuadro 14). Los estados de Jalisco y Morelos aportaron el mayor número de accesiones para el análisis AFLP y los de Sinaloa y Veracruz fueron los menos representados. De acuerdo con el IP los genotipos de los estados de Morelos y Guanajuato fueron los más diversos y los de Sinaloa los menos diversos. Con base en el IN los genotipos de Querétaro, Durango y Tamaulipas fueron los más diversos y los de Sinaloa, Veracruz y Chiapas los de menor diversidad (Cuadro 15).



**Figura 3.** Productos amplificados AFLP de la colección inédita de *P. vulgaris* L. del INIFAP (accesiones de la 1 a la 43).

**Cuadro 13. Productos amplificados obtenidos con cuatro combinaciones de iniciadores AFLP utilizadas para el análisis de la diversidad genética en la colección inédita de *P. vulgaris* L.**

| Combinación de iniciadores<br><i>EcoRI/MseI</i> | Bandas  |              |              | Porcentaje de polimorfismo (%) | CIP† |      |
|---|---------|--------------|--------------|--------------------------------|------|------|
|   | Totales | Monomórficas | Polimórficas |                                | IP‡  | IN£  |
| ACA/AGT   | 091     | 03           | 088          | 96.7                           | 0.73 | 0.30 |
| ACA/ATG   | 105     | 05           | 100          | 95.2                           | 0.68 | 0.25 |
| ACC/ATG   | 066     | 03           | 063          | 95.5                           | 0.64 | 0.26 |
| AGG/ATG   | 053     | 03           | 050          | 94.3                           | 0.77 | 0.24 |
| Total   | 315     | 14           | 301          | 95.4                           | 0.71 | 0.26 |

† CIP= Contenido de información polimórfica

‡ IP= Índice de diversidad de Powell

£ IN= Índice de diversidad de Nei.

**Cuadro 14. Análisis de la diversidad genética de la colección inédita de *P. vulgaris* L. con base en datos AFLP y región geográfica de origen.**

| Región       | Estados   | Número de accesiones | Índice de diversidad |      |
|--------------|---|----------------------|----------------------|------|
|              |   |                      | Powell               | Nei  |
| Norte        | Duran, Sinaloa y Tamaulipas                             | 19                   | 0.44                 | 0.23 |
| Norte-centro | Nayarit, Jalisco, Guanajuato y Michoacán                | 61                   | 0.55                 | 0.23 |
| Centro       | Morelos, Querétaro, Tlaxcala, México, Puebla y Guerrero | 76                   | 0.50                 | 0.23 |
| Sur          | Veracruz, Oaxaca y Chiapas                              | 19                   | 0.41                 | 0.20 |
| $\bar{X}$    |   | 44                   | 0.47                 | 0.22 |

Una correlación positiva altamente significativa ( $P \leq 0.01$ ) se observó entre el número de accesiones por estado y el grado de diversidad de acuerdo con el IP ( $r = 0.66$ ) mientras que para el IN no lo fue ( $P \geq 0.05$ ) ( $r = 0.32$ ). Se observó correlación positiva altamente significativa ( $P \leq 0.01$ ) entre el número de accesiones y la diversidad genética con el IP ( $\rho = 0.80$ ). La correlación entre el número de accesiones y el IN fue significativa ( $P \leq 0.05$ ) ( $\rho = 0.61$ ) (Cuadro 16).

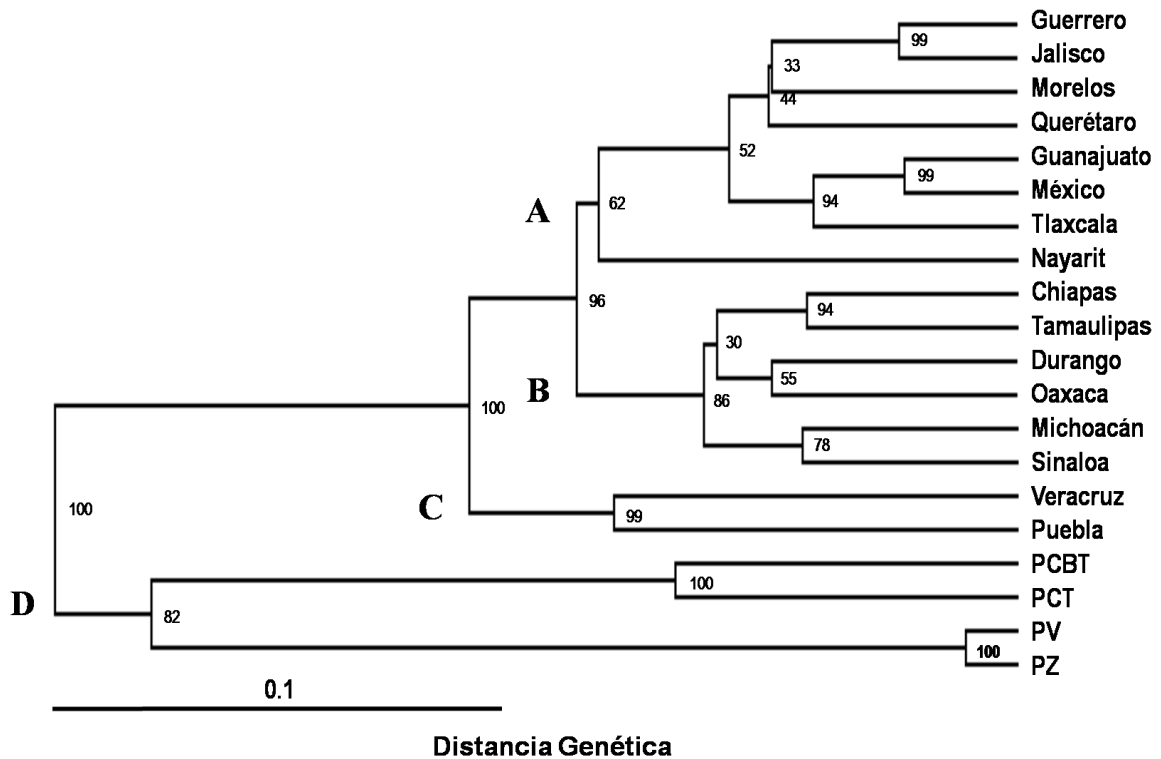
**Cuadro 15. Análisis de la diversidad genética de la colección inédita de *P. vulgaris* L. con base en datos AFLP y origen geográfico.**

| Estado     | Número de accesiones | Índice de diversidad |      |
|------------|----------------------|----------------------|------|
|            |                      | Powell               | Nei  |
| Morelos    | 33                   | 0.65                 | 0.23 |
| Nayarit    | 05                   | 0.43                 | 0.24 |
| Querétaro  | 12                   | 0.57                 | 0.27 |
| Tlaxcala   | 05                   | 0.50                 | 0.21 |
| México     | 08                   | 0.58                 | 0.22 |
| Veracruz   | 04                   | 0.39                 | 0.18 |
| Puebla     | 05                   | 0.47                 | 0.21 |
| Jalisco    | 36                   | 0.57                 | 0.23 |
| Guerrero   | 13                   | 0.50                 | 0.24 |
| Guanajuato | 13                   | 0.61                 | 0.23 |
| Durango    | 10                   | 0.54                 | 0.26 |
| Tamaulipas | 07                   | 0.50                 | 0.26 |
| Chiapas    | 06                   | 0.39                 | 0.19 |
| Michoacán  | 07                   | 0.38                 | 0.21 |
| Sinaloa    | 02                   | 0.28                 | 0.16 |
| Oaxaca     | 09                   | 0.46                 | 0.22 |
| $\bar{X}$  | 11                   | 0.49                 | 0.22 |

**Cuadro 16. Coeficientes de correlación entre el número de accesiones y el índice de diversidad genética de la colección inédita de *P. vulgaris* L. con base en datos AFLP.**

|                      | Coeficiente de Pearson |               | Coeficiente de Spearman |               |
|----------------------|------------------------|---------------|-------------------------|---------------|
|                      | Índice de Powell       | Índice de Nei | Índice de Powell        | Índice de Nei |
| Número de accesiones | 0.66                   | 0.32          | 0.80                    | 0.61          |

El análisis de conglomerados de los datos AFLP de la colección inédita de *P. vulgaris* L. indicó la formación de cuatro grupos genéticos de acuerdo con el estado de origen y con valores de robustez mayores a 95 % (Fig. 4).



**Figura 4.** Dendrograma de distancias genéticas de Nei y Dice con valores de bootstrap (1000 repeticiones) con base en el origen y los datos AFLP de la colección inédita de *P. vulgaris* L (PCTB= *P. coccineus* L. Blanco Tlaxcala, PCT= *P. coccineus* L. Tipo, PV= *P. vulgaris* L Pinto Villa y *P. vulgaris* L. Pinto Zapata). Los números en cada nodo indican grado de robustez del agrupamiento.

El grupo A contiene accesiones del norte-centro y centro de la República Mexicana con índices de diversidad altos ( $\bar{X} = 0.55$  para IP y  $\bar{X} = 0.23$  para IN). En este grupo se registraron tres colores primarios de la semilla (café palido a oscuro, gris-café a verdoso y crema pálido a ante) así como color del cotiledón unico (verde). El germoplasma proviene de Guerrero, Jalisco, Morelos, Querétaro, Guanajuato, México, Tlaxcala y Nayarit. El grupo B incluyó accesiones del norte, centro y sur de México con índices de diversidad intermedios ( $\bar{X} = 0.43$  para IP y 0.22 para IN). En este grupo se observaron dos colores primarios de la semilla (café pálido a oscuro y crema pálido a ante) y dos colores del cotiledón (verde y rosa). El germoplasma se colectó en Chiapas, Tamaulipas, Durango, Oaxaca, Michoacán y Sinaloa. El grupo C esta conformado por accesiones de Veracruz y Puebla con índices de diversidad bajos ( $\bar{X} = 0.43$  para IP y 0.20 para IN) con dos clases de color primario de la semilla (gris-café a verdoso y amarillo a amarillo verdoso) y un color del cotiledón (verde). El grupo D incluyó los cuatro testigos: las dos variedades mejoradas



de frijol común (Pinto Villa y Pinto Zapata) y las dos de frijol ayocote (*P. coccineus* L., variedad Blanco Tlaxcala y variedad tipo).

El ACoPs de los datos AFLP explicó el 53 % de la variabilidad total observada (CoP1= 28.3 % y CoP2= 24.7 %) y sus agrupamientos fueron diferentes en la mayoría de los casos de los obtenidos con el análisis de conglomerados (Fig. 5).

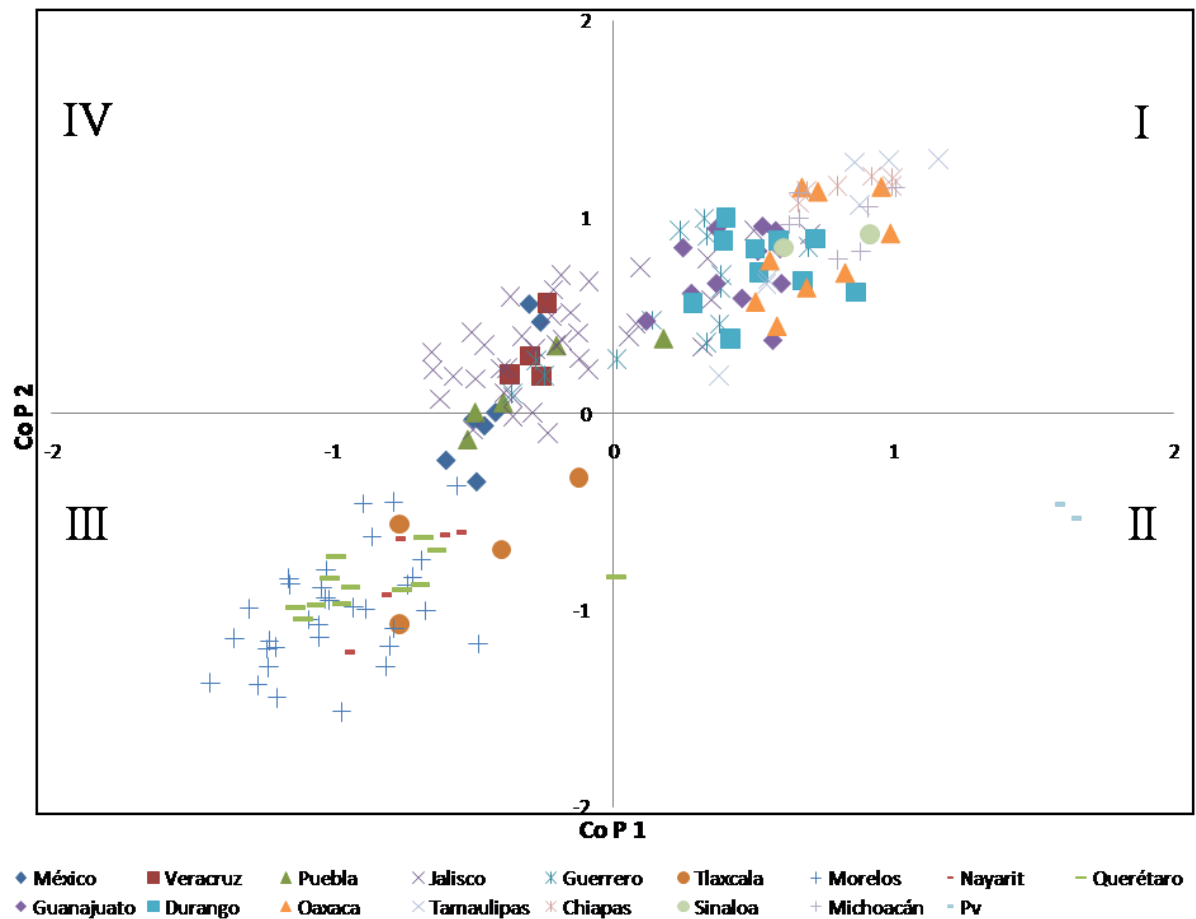
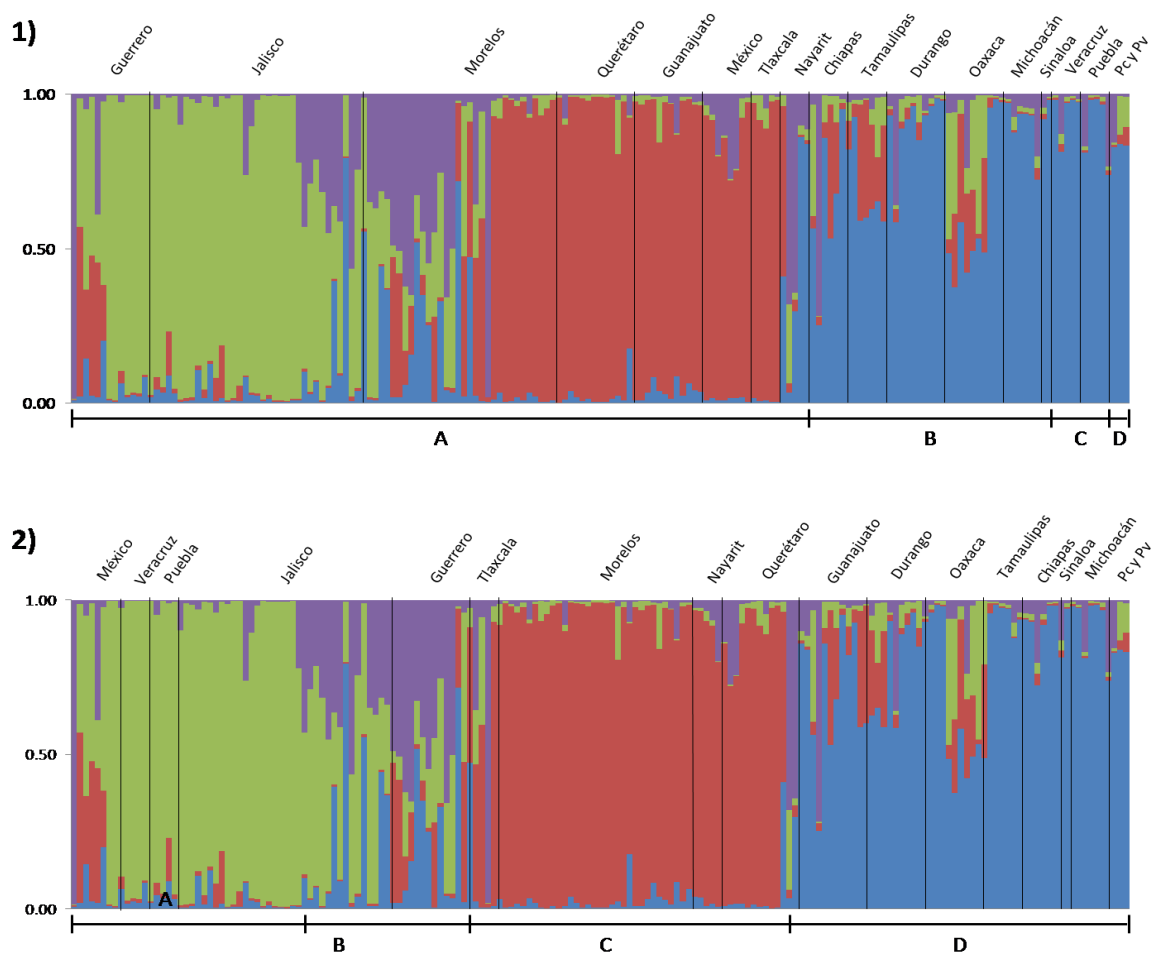


Figura 5. ACoPs con base en el origen y los datos AFLP de la colección inédita de *P. vulgaris* L.

En el cuadrante I se encuentra germoplasma de los estados de Guerrero, Guanajuato, Durango, Oaxaca, Tamaulipas, Chiapas, Sinaloa, Michoacán y algunas accesiones de Jalisco, mismos que con excepción de Guerrero conformaron el grupo B en el análisis de conglomerados. En el cuadrante II se encontraron las accesiones mejoradas de

frijol (Pintos Villa y Zapata) que se encontraron en el grupo D de aquel análisis. En el cuadrante III se ubicaron las accesiones de Morelos, Querétaro, Tlaxcala y Nayarit que pertenecieron al conglomerado A y se encuentran en los extremos del par inicial. Finalmente, en el cuadrante IV se encontraron accesiones de Jalisco y México que pertenecen al conglomerado A y Veracruz y Puebla que se incluyen en el conglomerado C.

El análisis de la estructura genética de las poblaciones de la colección inédita mediante el análisis de conglomerados con enfoque Bayesiano se adecuó a un valor  $K=4$ , tomando como referencia el número de grupos del análisis de conglomerados (Fig. 5).



**Figura 6.** Análisis bayesiano de la estructura genética de la colección inédita de *P. vulgaris* L. con base en el estado de origen y datos AFLP. El eje X representa el origen del germoplasma y los grupos que forman mientras que el Y el valor de coancestría de cada accesión. 1) Arreglo de las accesiones similar al análisis de conglomerados de distancias genéticas de Nei y Dice (Fig 3). 2) Arreglo de las accesiones de acuerdo con el valor de coancestría.

La primera estrategia de agrupamiento fue un arreglo similar al del análisis de conglomerados (Kwak *et al.*, 2008) que no se consideró óptima, ya que un grupo incluyó accesiones con distinto nivel de coancestría. La segunda estrategia se basó en un arreglo de genotipos con base en los valores de coancestría, misma que ofreció una idea más clara sobre la carga genética y la estructura genética del germoplasma. El grupo A está conformado por germoplasma de los estados de México, Veracruz, Puebla y Jalisco. El B por accesiones de Jalisco y Guerrero; el grupo C incluye accesiones de Tlaxcala, Morelos, Nayarit y Querétaro y grupo D germoplasma de Guanajuato, Durango, Oaxaca, Tamaulipas y Chiapas, así como las accesiones mejoradas de frijol común (Pinto Villa y Pinto Zapata) y frijol ayocote (variedad Blanco Tlaxcala y variedad Tipo).

## VIII. DISCUSIÓN

En la colección inédita de frijol el color primario café fue el más representado, seguida por el crema, el café a verdoso y el negro. Aproximadamente dos terceras partes del germoplasma no presentaron color secundario y donde si estuvo presente, se formaron patrones de moteado con manchas romboides o rayas, principalmente. La mayoría de las semillas registró brillantez intermedia. Predominaron las semillas con venación y todas registraron la forma cúbica. El número de días a la emergencia en promedio fue de 5 días y las plantas alcanzaron la etapa V2 dos días después. La longitud del foliolo central en promedio fue de 4.0 cm y el ancho de 2.0 cm. El color del cotiledón predominante fue el verde y del hipocotilo, rosa. Vargas-Vázquez *et al.* (2006) caracterizaron morfológicamente la colección núcleo de la forma domesticada de *P. vulgaris* L. del INIFAP-México encontrando que el color predominante fue el crema y dos terceras partes no presentó color secundario y a donde ocurrió se observó un patrón de moteado uniforme con manchas romboides o rayas, principalmente. La mayoría de las semillas registró brillantez intermedia o mate con forma cúbica u oval. El número de días a la emergencia en promedio fue de 10 y de 13 para que las plantas alcanzaran la etapa V2. La longitud del foliolo central en promedio fue de 10.1 cm en cuanto a la longitud y 7.6 cm de ancho. El color del cotiledón e hipocotilo predominante fue verde. Por su parte González *et al.* (2007), al caracterizaron morfológicamente 227 accesiones domesticadas (criollas) de *P. vulgaris* del banco de germoplasma del INIA-CENIAP de Venezuela encontraron que el color primario predominante fue el negro y sólo 11.8 % presentaron color secundario y patrón de moteado. Las accesiones en su mayoría registraron la brillantez tipo mate y la presencia de venación; al igual que las formas más frecuentes fueron la truncada y la arriñonada. Cerón *et al.* (2001) al caracterizar morfológicamente 151 accesiones domesticadas (criollos) de *P. vulgaris* de tipo arbustivo del banco de germoplasma de CORPOICA en Mosquera, Colombia encontraron que el número de días a la emergencia promedio fue de 16 días y la longitud del foliolo central en promedio fue de 6.2 y 6.0 cm de ancho.

El color de la semilla en los genotipos silvestres es una característica definida por la selección natural que cumple la función de mimetizar a las semillas con el suelo para ser menos visibles ante los depredadores (Gepts y Debouck, 1991) Por tal motivo se podría

pensar que la colección inédita de frijol presentó colores de semilla oscuros en su mayoría. Por su parte, en los genotipos cultivados de frijol el color es una característica definida por el hombre como resultado del proceso de domesticación y que se asocia con las preferencias del consumidor a nivel regional (Voyses y Dessert, 1991). Por ello, podría suponerse que el color crema, que representa una porción considerable de la colección, podría haber surgido como resultado de la cruce de materiales silvestres por cultivados en la zona del altiplano mexicano, la cual esta ampliamente representada y donde existe amplia aceptación por las clases comerciales de las razas Jalisco y Durango con dicho color (Vargas-Vázquez *et al.*, 2008). Todo ello con el proceso incipiente de domesticación continuo por los campesinos de dicha región (Beebe *et al.*, 1997).

Hasta el momento no se ha reportado si la brillantez de la semilla es una característica definida por el origen genético. En el presente trabajo y en el de Vargas-Vázquez *et al.* (2006) genotipos del acervo Mesoamericano muestran brillantez de la semilla intermedia como predominante, lo que difiere de González *et al.* (2007) donde el mate predominó y cuyas accesiones pertenecen al acervo Andino. Nuestros resultados y los de Vargas-Vázquez *et al.* (2006) en cuanto a la forma de semilla son consistentes con lo reportado por Singh *et al.* (1991) para el acervo Mesoamericano, al igual que los de González *et al.* (2007) para el acervo Andino. El color, forma y tamaño de la semilla han sido los principales criterios de selección responsables del mantenimiento y de la ampliación de la variabilidad genética en frijol y en parte de la forma cultivada. Estas características, junto con la textura o el grado de brillantez, son las más utilizadas en la clasificación comercial de los principales tipos de frijol (Voyses y Dessert, 1991).

Las diferencias en cuanto a los días a la emergencia y días a la etapa V2 pueden explicarse por el tiempo de almacenamiento de la semilla, ya que las semillas regeneradas recientemente como las utilizadas en el presente trabajo muestran mayor vigor y alcanzan más rápido la etapa V2 (Song, 1990). El rango considerable (10 d) observado en las accesiones de frijol puede indicar el grado de domesticación de ciertos genotipos, ya que en las variedades silvestres se observa la dormancia que retarda la emergencia (Singh, *et al.*, 1991a). Las diferencias en cuanto al tamaño del foliolo central son el resultado del proceso de domesticación ya que las variedades domesticadas muestran un aumento en el tamaño o la expresión de ciertas características (Singh *et al.*, 1999). Por su parte, Ligarreto (2003)

menciona que generalmente los materiales andinos tienen hojas más grandes que los mesoamericanos y por consiguiente el tamaño de la hoja es una característica útil en la diferenciación de germoplasma entre acervos genéticos. En cuanto al color del cotiledón, nuestros resultados y los de Vargas-Vázquez *et al.* (2006) indican que en el acervo Mesoamericano predomina el color verde, pero deberían evaluarse accesiones del acervo andino para ratificar dicha suposición.

Los primeros tres CPs del ACP explicaron más del 65 % de la varianza morfológica total del germoplasma de la colección. Este resultado es alto comparado con lo reportado por Vargas-Vázquez *et al.* (2008) quienes encontraron que, con base en los primeros cinco CPs, se explicaba el 45 % de la varianza total; sin embargo es menor a lo reportado por Castillo-Mendoza *et al.* (2006) quienes encontraron que con dos CPs se explicaba 82 % de la variabilidad morfológica en frijol común y ayocote. Nuestros resultados indican que los primeros tres componentes incluyen descriptores con capacidad para discriminar las accesiones. Los vectores propios de los CPs indicaron que las variables con mayor poder explicativo fueron la venación, días a emergencia y ancho del foliolo central. Esto difiere de Vargas-Vázquez *et al.* (2008) quienes reportaron que el color del cotiledón y del hipocotilo; de las alas y del estandarte de la flor, al igual que los días a la aparición del botón floral, floración y madurez fisiológica y el número de vainas y semillas por planta eran más explicativas en la colección núcleo de *P. vulgaris* cultivado de México. Estos resultados enfatizan la necesidad de realizar una caracterización morfológica y agronómica más detallada de esta colección inédita de frijol, tomando en consideración descriptores de campo que no fueron analizados en esta ocasión por cuestiones de tiempo y la cantidad de semilla disponible.

El análisis de conglomerados de datos morfológicos dividió al germoplasma en cuatro grupos con base en el origen geográfico. No se observó agrupamiento entre genotipos de estados vecinos o de la misma región, ya que aquellos estados del Sur y del Norte o Este y Oeste de México se ubicaron dentro de un mismo grupo (Veracruz y Sinaloa; Guerrero y Tamaulipas). Este fenómeno podría ser el resultado del bajo número de

características evaluadas en la colección, lo que no permite diferenciar con base en la región geográfica de origen al germoplasma. En otros trabajos se han utilizado descriptores tales como el peso de 100 semillas; longitud de la vaina y ápice de la vaina; número de nudos y de vainas por planta y la época de la madurez fisiológica (Ligarreto, 2003) que no se consideraron en este estudio y que lograron diferenciar entre germoplasma del acervo Mesoamericano y Andino. Además, otro aspecto que pudo influir los resultados fue el tamaño de la muestra que para algunos estados es pequeña y no representativa. También es importante considerar el hecho de que las condiciones agroecológicas bajo las cuales han estado evolucionando los genotipos de frijol podrían originar fenotipos similares. Por ejemplo, los estados con mayor diversidad morfológica (Morelos y Jalisco) tendieron a agruparse, mientras que en otros grupos se incluyeron genotipos con hojas pequeñas y precoces o bien, germoplasma con semillas color crema y con baja diversidad morfológica (Sinaloa).

Los resultados del análisis con marcadores SCAR asociados con la resistencia a antracnosis y tizón común indicó la presencia de siete de los diez marcadores analizados, lo cual podría ser consecuencia de que ciertos genes o QTLs están presentes solo en algunos grupos varietales, razas o acervos genéticos (Geffroy *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 2007) debido a que dichos marcadores se han generado a partir de líneas mejoradas de frijol como resultado de cruza intraespecíficas e interespecíficas. El germoplasma de los estados de Guanajuato, Tamaulipas y Tlaxcala mostró la frecuencia relativa promedio más alta para los SCARs asociados con la resistencia a antracnosis, lo que difiere de Gill-Langarica (2008) quien observó que el germoplasma de Yucatán y Sinaloa mostró los valores más altos al evaluar cuatro marcadores SCAR en frijoles domesticados (SY20, SAS13 SAB3 y SZ04). El valor numérico mayor reportado por Gill-Langarica (2008) puede deberse por un lado a las variantes en los marcadores analizados, ya que en el presente trabajo no se utilizaron los SCARs SY20 y SZ04 ligados a las variantes alélicas de los genes de resistencia a la antracnosis *Co-4* y *Co-6* (Kelly *et al.*, 2003). También influyó la naturaleza

genética de los genotipos utilizados, los cuales si bien pertenecen al acervo Mesoamericano se diferencian en que unos tienden a ser silvestres y los otros cultivados por lo cual la diferencia en los valores numéricos sería resultado del proceso de selección indirecta de los genes que confieren resistencia contra las enfermedades en un incipiente proceso de domesticación por parte de los agricultores, así como la introgresión de variantes alélicas y/o nuevos genes de variedades no adaptadas a una región particular (Geffroy *et al.*, 1998). Las diferencias en cuanto a los estados reportados con mayor frecuencia de marcadores SCAR, básicamente se deben a que Yucatán no se consideró en este estudio y Sinaloa está pobremente representado, ya que hasta el momento no se ha establecido con claridad la existencia de parientes silvestres en dichos estados, lo cual no significa que no existan; sino que trabajos previos se han enfocado en el estudio de frijoles nativos del Altiplano Mexicano (Guanajuato, Jalisco y Michoacán, básicamente) en la búsqueda de la zona agroecológica bajo la cual se domesticó el frijol del acervo Mesoamericano (Papa y Gepts, 2003; Zizumbo-Villareal *et al.*, 2005; Kwak *et al.*, 2009; Kwak y Gepts, 2009).

Los resultados de este trabajo indican que el germoplasma de Guanajuato, Tamaulipas y Tlaxcala contiene alta proporción de variantes alélicas de los genes *Co-4* y *Co-5* (Kelly y Vallejo, 2004; Vidigal-Filho *et al.*, 2006; Goncalves-Vidigal *et al.*, 2007). Esto es consistente con lo reportado para el acervo Mesoamericano que muestra 10 *loci* de genes de resistencia a la antracnosis (*Co-2* al *Co-11*) mientras que el acervo andino tiene tres (*Co-1*, *Co-12* y *Co-13*). Nuestros resultados deben tomarse con precaución antes de proponer ciertos materiales genéticos como fuentes de resistencia a la antracnosis en programas de mejoramiento de frijol ya que ciertos marcadores están ubicados a distancias de ligamiento considerables del gen de interés. Por ejemplo, SAP3 se encuentra a 12.98 cM del gen de resistencia *Co-5* y esto podría generar falsos positivos por posibles eventos de recombinación (Kelly y Vallejo, 2004). Además, una vez detectado dicho marcador tendría que validarse forzosamente durante la selección asistida por marcadores moleculares (SAMM) mediante pruebas de patogenicidad y de reacción en invernadero y campo. También hay que considerar el estado genético de las accesiones ya que habría que recordar



que se detectaron en materiales silvestres y en el SAMM se utilizan líneas con alto grado de endogamia. Por otra parte, cabría la posibilidad de que el gen de resistencia este ligado a alguna característica no deseable por parte de los agricultores

El germoplasma de Tlaxcala y Guanajuato mostró las frecuencias relativas más altas de SCARs asociados con la resistencia al tizón común. Esto también diferente de los resultados de Gill-Langarica (2008) pues encontró que el germoplasma de Quintana Roo, San Luis Potosí y Yucatán obtuvo las frecuencias relativas más altas al evaluar tres marcadores asociados con la resistencia a dicha enfermedad (BAC6, SAP6 y SU91). Las diferencias radican, como ya se mencionó anteriormente tanto por la variación que existe en los marcadores utilizados, ya que en este trabajo se utilizó además de los analizados por Gill-Langarica (2008) el SCAR LG5 asociado con un QTL mayor (Yu *et al.*, 2000) y a que únicamente se registró en dos accesiones del estado de Morelos, por lo cual la frecuencia relativa se redujo. Además, influyó la naturaleza genética del germoplasma analizado. Las diferencias en la frecuencia de aparición del SCAR en el germoplasma de los estados reportados es similar a lo explicado para el caso de la antracnosis. Estos resultados deben tomarse también con precaución para proponer fuentes de resistencia a tizón común, ya que hay que considerar la distancia de ligamiento entre el marcador y el QTL asociado con la resistencia a la enfermedad para evitar los falsos positivos resultado de posibles eventos de recombinación; la estabilidad de la asociación del QTL para explicar la variación fenotípica de la respuesta a la enfermedad bajo diversos ambientes y genotipos y realizar las pruebas de patogenicidad correspondientes tanto en invernadero como en campo (Fernández *et al.*, 2007).

El germoplasma de Guanajuato y Tlaxcala localizados en la región del norte-centro y centro del país respectivamente, mostró frecuencias altas para los SCARs asociados con la resistencia a ambas enfermedades. Esto es un indicativo de la amplia variabilidad genética de frijol existente en dichas regiones, pero además los resultados sugieren la existencia de amplia variabilidad patogénica por parte del hongo (en el caso de la antracnosis). Las regiones del norte-centro y centro del país registraron mayor número de

patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum* en México (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2006). Por tal motivo los genotipos de dicha región han estado sujetos a mayor presión de selección y han tenido la necesidad de generar y por ende aumentar el número de genes de resistencia contra la enfermedad, en una constante coevolución con el patógeno. Para el caso del tizón común, se podría inferir algo parecido, aunque no hay evidencias al respecto.

Mediante el análisis AFLP se obtuvo un polimorfismo de 95.4 % similar a lo reportado por Papa y Gepts (2003) en poblaciones silvestres de Mesoamérica (88.8 %) y superior comparado con el análisis genético de poblaciones domesticadas de la misma región geográfica (74.3 %) y silvestres del acervo Andino (33.3 %). La diversidad genética encontrada fue alta (IN= 0.22) comparada con lo reportado para genotipos silvestres del acervo Andino (IN= 0.10) y similar a lo registrado por Papa y Gepts (2003) (IN= 0.24), Zizumbo-Villareal *et al.* (2005) (IN= 0.24) y Rossi *et al.* (2009) (IN= 0.22) en accesiones silvestres del acervo Mesoamericano. Lo anterior también es consignado por Chacón *et al.* (2005) quienes caracterizaron germoplasma de frijol de ambos acervos genéticos y observaron mayor variabilidad genética en haplotipos de ADN de cloroplasto de frijol de la región de Mesoamérica respecto al germoplasma de los Andes (10 y 8 respectivamente). Los frijoles de la región del norte-centro mostraron la mayor diversidad genética (IP= 0.55 e IN= 0.23), lo cual es consistente con lo reportado por Papa y Gepts (2003) (IN= 0.24) quienes a su vez reportaron que la diversidad genética disminuye conforme se avanza hacia el sur de México. El norte-centro de México se considera una región geográfica con amplia variabilidad genética de frijol y bajo la cual aún se encuentran especies silvestres tanto de frijol como de maíz, por lo cual se ha sugerido que es una zona de domesticación de ambas especies bajo el sistema de cultivo denominado como milpa (Kwak *et al.*, 2009).

El germoplasma con mayores valores de diversidad genética se encontró en Morelos y Guanajuato de acuerdo con el IP mientras que con base en el IN este se ubicó en Querétaro, Durango y Tamaulipas. Las diferencias entre ambos índices de diversidad se deben a que el IP es un parámetro del grado del polimorfismo presente en la población

mismo que es influenciado por el número de individuos analizados según los resultados obtenidos por la correlación de Pearson; mientras que el IN es una medida de heterocigosidad que en este trabajo no mostró correlación con el número de individuos y además es solo una aproximación puesto que en marcadores moleculares de naturaleza dominante es difícil estimarlo con precisión.

La colección inédita de frijol fue dividida en cuatro grupos relacionados entre sí para explicar la estructura genética de las poblaciones. Estos grupos no fueron consistentes a través de los dos métodos de clasificación y no mostraron una distribución de acuerdo con el origen geográfico o agroecológico, lo cual ya había sido reportado por Kwak *et al.* (2008) al evaluar poblaciones silvestres de *P. vulgaris* de las regiones del norte, norte-centro y centro de México. Esto podría deberse a que los materiales silvestres de *P. vulgaris* muestran diferencias genéticas mínimas entre si y a que el número de *loci* analizados no fue suficiente para discriminar materiales de regiones diferentes. Las variaciones en los grupos de genotipos podría deberse a los parámetros considerados para cada análisis. Por un lado, los métodos basados en distancias genéticas se fundamentan en la presencia o ausencia de un *locus* (similitud o disimilitud entre individuos), mientras que el análisis bayesiano es un método estadístico basado en modelos que se fundamentan en la frecuencia del alelo de un *locus* (Pritchard *et al.*, 2000; Bonin *et al.*, 2007). Por otra parte, el agrupamiento de genotipos obtenido con el análisis bayesiano fue similar al resultante con el ACoP, lo que ratifica la validez de los agrupamientos dispuesta a través del plano cartesiano (Dallas, 1998). Los grupos identificados por el análisis bayesiano fueron una mezcla de la riqueza genética del acervo Mesoamericano entre las formas silvestres, semisilvestres y domesticadas puesto que todos los grupos comparten cierto grado de coancestría entre sí. Esto último podría ser resultado del flujo genético constante y consistente que ha existido entre el germoplasma de *Phaseolus* y que no permite discriminar de acuerdo con el origen agroecológico. Resultados similares se han encontrado al analizar accesiones domesticadas de frijol de las razas Durango y Jalisco, mismas que comparten un alto grado de ascendencia y, por tanto, son difíciles de diferenciar por

métodos genéticos moleculares (Kwak *et al.*, 2009; Kwak y Gepts, 2009). El grupo A del análisis bayesiano se ubicó en el cuadrante IV del ACoP (México, Veracruz, Puebla y la mayoría de las accesiones de Jalisco) con excepción de algunas accesiones de México que se ubican en el III, que a su vez muestran cierta coancestría con el grupo B. El grupo B se ubicó en el cuadrante I (algunas accesiones de Jalisco y de Guerrero) y es un grupo que muestra un alto grado de coancestría con el A y C. El C se ubica en el cuadrante III (Tlaxcala, Morelos, Nayarit y Querétaro) y algunas accesiones de Tlaxcala muestran coancestría con el B. El D se ubica en los cuadrantes I y II y es el único que se dispersó en dos cuadrantes diferentes del ACoP (Guanajuato, Durango, Oaxaca, Tamaulipas, Chiapas, Sinaloa, Michoacán, las accesiones mejoradas de frijol común Pinto Villa y Zapata, y ayocote variedad Blanco Tlaxcala y la variedad Tipo)

Con base en los resultados de este trabajo se asume que no existen haplotipos compartidos entre las accesiones que conforman la colección inédita de *P. vulgaris*. Lo anterior indica que la selección de los materiales fue realizada de manera apropiada, algo similar a lo reportado por Gill-Langarica (2009) al caracterizar la colección núcleo de *P. vulgaris* de la forma domesticada del INIFAP. Sin embargo, los resultados deberían confirmarse mediante la utilización de un mayor número de combinaciones y/o de marcadores codominantes como los microsatélites para obtener una mayor robustez estadística de los agrupamientos y corroborar la no existencia de haplotipos compartidos.

La amplia variabilidad genética existente en la colección inédita de *P. vulgaris* con base en los descriptores morfológicos y moleculares y a la detección de marcadores moleculares tipo SCAR asociados con la resistencia a enfermedades de importancia nacional (antracnosis y tizón común) enfatizan la necesidad de continuar con la evaluación de poblaciones silvestres y semisilvestres, dado que tienen un valor incalculable como fuente de genes útiles para los fitomejoradores. De esta manera se podrían obtener variedades comerciales con calidad y resistentes a factores bióticos y abióticos, reduciendo los costos de producción y contribuyendo así con la sustentabilidad económico-ambiental de la especie y de la agricultura en general.

## IX. CONCLUSIONES

Existe una amplia variabilidad genética en el germoplasma de la colección inédita de *P. vulgaris* L (silvestres x cultivados) del INIFAP que reflejan la existencia de un patrón genético definido con base en los datos moleculares pero no agroecológico.

Existen genotipos con base en el origen en la colección inédita de *P. vulgaris* L (silvestres x cultivados) del INIFAP con utilidad potencial como nuevas fuentes de resistencia a antracnosis [*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn) (teleomorfo *Glomerella lindemuthiana* Shear)] y tizón común [*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith)], particularmente originarios del estado de Guanajuato y Tlaxcala.

## X. RECOMENDACIONES

Los resultados de este trabajo sugieren aumentar el número de accesiones de los estados pobremente representados para evitar sesgo por el tamaño, ya que en la colección inédita de frijol tiene disparidades en dichos tamaños.

Además, es conveniente realizar una caracterización morfoagronómica con mayor número de descriptores, tanto cualitativos como cuantitativos en semilla y durante las fases vegetativa y reproductiva de la planta que no fueron consideradas en este estudio por cuestiones de tiempo y disponibilidad de semilla y que ofrecerían un panorama más completo sobre la estructura de la colección.

Es recomendable luego hacer un análisis genético con mayor robustez estadística utilizando marcadores moleculares codominantes que son más informativos y podrían hacer un escrutinio más detallado de la población.

Finalmente, se sugiere ampliar el tamaño de la colección núcleo ya que el género *Phaseolus* se distribuye desde el norte de México hasta el sur de Argentina, por lo que resultaría conveniente, en la medida de lo posible aumentar la cantidad de los estados representados con el interés de precisar el origen de las razas de frijol del acervo Mesoamericano.

## XI. LITERATURA CITADA

- Acosta-Gallegos, J. A., Kelly, J. D. and Gepts, P. 2007. Prebreeding in common bean and use of genetic diversity from wild germoplasma. *Crop Sci.* 47: 44-59.
- Adam-Blondon, A. F., Seignac, M., Bannerot, H. and Dron, M. 1994. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (*Are*) conferring resistance to anthracnose in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 88: 865-870.
- Adams, M. W. and Martin, G. B. 1988. Genetic structure of bean landraces in Malawi. *In:* P. Gepts (ed.), *Genetic Resources of Phaseolus Beans*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holland. pp. 163-184.
- Agarwal, M., Shrivastava, N. and Padh, H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* 27: 617-631.
- Althoff, D. M., Gitzendanner, M. A., Segraves, K. A. 2007. The utility of amplified fragment length polymorphisms in phylogenetics: a comparison of homology within and between genomes. *Syst. Biol.* 56: 477-484.
- Alzate, M. A. L., Menarim, H., Baia, G. S. Paula, T. J., Paula, T. J., Souza, K. A., Costa. M. R., Barros, E. G. and Moreira, M. A. 2001. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean differential cultivar G 2333 and identification of a new molecular marker linked to the Co-4(2) gene. *J. Phytopathol.* 149: 259-264.
- Aparicio-Fernández, X., Reynoso-Camacho, R., Castaño-Tostado, E., García-Gasca, T., González- De Mejía, E., Guzmán-Maldonado, S. H., Elizondo, G., Gabra-Yousef, G., Lila, M. A. and Loarca-Pina, G. 2008. Antiradical capacity and induction of apoptosis on HeLa cells by a *Phaseolus vulgaris* extract. *Plant Foods Hum. Nutr.* 63: 35-40.
- Avendaño-Arrazate, C. H., Ramirez-Vallejo, P., Castillo-González, F., Chávez-Servia, J. L. y Rincón-Enrique, G. 2004. Diversidad isoenzimática en poblaciones nativas de frijol negro. *Rev. Fitotec. Mex.* 27: 31-40.
- Babot, M. P., Oliszewski, N. and Grau, A. 2007. Análisis de caracteres macroscópicos y microscópicos de *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae, Faboideae) silvestres y cultivados del noroeste argentino: Una aplicación en arqueobotánica. *Darwiniana* 45: 149-162.
- Bai, Y., Michaels, T. E. and Pauls, K. P. 1997. Identificación of RAPD marker linked to common bacterial blight resistance genes in *Phaseolus vulgaris* L. *Genome* 40: 544-551.
- Beebe, S., Toro, O. C., González, A. V., Chacón, M. I. and Debouck, D. G. 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. Resour. and Crop Evol.* 44: 73–91.
- Becerra, V. V. y Paredes M. C. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agric. Téc.* 60: 1-12.
- Bonin, A., Ehrich, D. and Manel, S. 2007. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Mol. Ecol.*: 3737–3758.
- Brick, M. A., Byrne, P. F., Schwartz, H. F., Ogg, J. B., Otto, K., Fall, A. L. and Gilbert, J. 2006. Reaction to three races of *Fusarium* wilt in the *Phaseolus vulgaris* core collection. *Crop Sci.* 46: 1245-1251.
- Carvalho, M., R. and Sgarbieri, V. C. 1998. Relative importance of phytohemagglutinin (lectin) and trypsin-chymotrypsin inhibitor on bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein absorption and utilization by the rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (Tokyo) 44: 685–696.
- Cerón, M. S., Ligarreto., G. M., Moreno, J. D. y Martínez O. 2001. Selección de variables cuantitativas y clasificación de 22 acepciones de frijol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.). *Rev. Corpoica* 3: 31-38.
- Chacón, M. I., Pickersgill, S. B. and Debouck, D. G. 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.
- Chelkowski, J. and Stepien, L. 2001. Molecular markers for leaf rust resistance genes in wheat. *J. Appl. Genet.* 42: 117–126
- Debouck, D. G. 1986. Primary Diversification of *Phaseolus* in the Americas: Three Centres? *Plant Genet. Res. Newsl.* 67: 2-6.
- Fall, A. L., P. F. Byrne, G. Jung, D. P. Coyne, Brick, M. A. and Schwartz, H. F. 2001. Detection and mapping of a major locus for *Fusarium* wilt resistance in common bean. *Crop Sci.* 41: 1494–1498.
- Fanghanel, H. 1997. Experiencias de bolsas de productos agrícolas en Latinoamérica. Ponencia en congreso. ASERCA, Culiacán, México.
- Fernández, S., Ibeas, A., Asensio, C. y Asensio-Manzamera, M. C. 2007. Comparación entre la selección directa y la selección asistida por marcadores moleculares de la resistencia a bacteriosis común en judía. *En: Actas de Horticultura* 48. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Albacete, España. 101-107 pp.
- Frankel, O. H., Brown, A. H. D. and Burgon, J. J. 1995. Conservation of Plant Biodiversity. Cambridge University Press. Sundridge, United Kingdom. 299 p.



- García, E. H., Peña-Valdivia, C. B., Rogelio-Aguirre, J. R. and Muruaga, J. S. M. 1997. Morphological and agronomic traits of a wild population and an improved cultivar of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ann. Bot.* 79: 207-213.
- Geffroy, V., Creusot, F., Falquet, J., Seignac, M., Adam-Blondom, A. F., Bannerot, H., Gepts, P. and Dron, M. 1998. A family of LRR sequences in the vicinity of the Co-2 locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 96: 494-502.
- Gepts, P. 1999. What can molecular markers tell us about the process of domestication in common bean? *In: Damania, A., Valkoun, J., Willcox, G., Qualset, C. O. The Origins of agriculture and the domestication of crop plants. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA). Aleppo, Syria.* pp. 198-209.
- Gepts, P. and Debouck, D. 1991. Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *In: A. Van Schoonhoven and O. Voysest, (eds.). Common Beans Research for Crop Improvement. C.A.B. Int. Wallingford, U.K. and CIAT, Cali, Colombia.* pp. 7-53.
- Gill-Langarica, H. 2009. Diversidad genética de frijol común y su implicación en el mejoramiento genético asistido en México. Tesis de Doctorado en Tecnología Avanzada. CICATA-CBG-IPN. Alt. Tamps. Méx. pp. 62-66.
- Gonçalves-Vidigal, M. C., Silva, C. R., Vidigal-Filho, P. S., Gonela, A. and Vinícius-Kvitschal, M. 2007. Allelic relationships of anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) resistance in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Michelite and the proposal of a new anthracnose resistance gene, *Co-11*. *Genet. and Mol. Biol.* 30: 589-593.
- Gonzalez-De Mejia, E., Valadez-Vega, M. C., Reynoso-Camacho, R. and Loarca-Pina, G. 2005. Tannins, trypsin inhibitors and lectin cytotoxicity in tepary (*Phaseolus acutifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris*) beans. *Plant Foods Hum. Nutr.* 60: 137-145.
- González, G., Pérez, D., Trujillo, A. y Gutiérrez, M. 2007. Caracterización morfológica de accesiones locales de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) colectadas en diversas regiones del país. *En: Memoria del XVII Congreso Venezolano de Botánica.* pp: 468-470
- Guo, W., Zhang, T., Shen, X., Yu, J. Z., Kohel, R. J. 2003. Development of SCAR marker linked to a major QTL for high fiber strength and its usage in molecular-marker assisted selection in upland cotton. *Crop Sci.* 43: 2252-2256.
- Hidalgo, R. 1991. Conservación *ex situ*. *En: Técnicas para el manejo y uso de los recursos genéticos vegetales. Castillo, R., Estrella, J. y Tapia, C. (eds.). Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Quito, Ecuador.* pp. 71-87.

- Ibarra-Perez, F. J., Ehdaie, B. and Waines, J. G. 1997. Estimation of outcrossing rate in common bean. *Crop Sci.* 37: 60-65.
- International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR). 1982. *Phaseolus vulgaris* Descriptors Plant Production and Protection Division. FAO. Rome, Italy. 32 p.
- International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR). 1991. Elsevier's Dictionary of Plant Genetic Resources. Elsevier Science Publishers B.V. The Netherlands, Holanda. 187 p.
- Islam, F. M. A., Basford, K. E., Jara, C., Redden, R. J. and Beebe, S. 2002a. Seed compositional and disease resistance differences among gene pools in cultivated common bean. *Genet. Resour. and Crop Evol.* 49: 285-293.
- Islam, F. M. A., Basford, K. E., Jara C., Redden, R. J., Gonzalez, A. V., Kroonenberg, P. M. and Beebe, S. 2002b. Genetic variability in cultivated bean beyond the two major gene pools. *Genet. Resour. and Crop. Evol.* 49: 271–283.
- Jaramillo, S. y Baena, M. 2000. Material de apoyo a la capacitación en conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Cali, Colombia. 122 p.
- Jiménez, P y Collada, C. 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y uso en los programas de conservación. *Invest. Agr.* 9: 237-248.
- Jung, G., Skroch, P. W., Nienhuis, J., Coyne, D. P., Arnaud-Santana, E., Ariyaratne, H. M. and Marita, J. N. 1999. Confirmation of QTL associated with common bacterial blight resistance in four different genetic backgrounds in common bean. *Crop Sci.* 39: 1448-1455.
- Karmeswara-Roa, N. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *Afr. J. Biotechnol.* 3: 138-145.
- Kaplan, L. 1965. Archeology and domestication in American *Phaseolus* (beans). *Econ. Bot.* 19: 358-368.
- Kaplan, L.; Lynch, T.F.; Smith, C.E. 1973. Early cultivated beans (*Phaseolus vulgaris*) from an intermontane Peruvian valley. *Science* 179: 76-77.
- Kelly., J. and Vallejo, V. 2004. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. *HortScience* 39:1196–1197
- Kelly, J.D., Gepts, P., Miklas, P. N. and Coyne, D. P. 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.

- Koenig, R. and Gepts, P. 1989. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of genetic diversity. *Theor. Appl. Genet.* 78: 809-817.
- Kwak, M. and Gepts, P. 2009. Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). *Theor. Appl. Genet.* 118:979–992.
- Kwak, M., Kami, J. A. and Gepts, P. 2009. The putative mesoamerican domestication center of *Phaseolus vulgaris* is located in the Lerma–Santiago basin of Mexico. *Crop Sci.* 45: 554-563
- Laeremans, T. and Vanderleyden, J. 1998. Review: Infection and nodulation signalling in *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1: 787-808.
- Li, G., Quiros, C. F. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theor. Appl. Genet.* 103: 455–546.
- Ligarreto, G. A. 2003. Caracterización morfológica de germoplasma. Estudios de casos. Caso 2: Análisis de la variabilidad genética en frijol. *In:* Franco, T, y Hidalgo, R. (eds). Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín Técnico 8. IPGRI. Roma, Italia. pp: 40-49.
- McDermott, J. M., Brandle, U., Dutly, F., Haemmerli, U. A., Keller, S., Muller, K. E., Wolf, M. S. 1994. Genetic variation in powdery mildew of barley: development of RAPD, SCAR and VNTR markers. *Phytopathology* 84: 1316–1321.
- Mian, M. A. R., Hopkins, A. A., Zwonitzer, J. C. 2002. Determination of genetic diversity in tall fescue with AFLP markers. *Crop Sci.* 42: 944–950.
- Miklas, P. N., Larsen, R. C., Riley, R. and Kelly, J. D. 2000. Potential marker-assisted selection for bc-1<sup>2</sup> resistance to bean common mosaic potyvirus in common bean. *Euphytica* 116: 211-219.
- Miranda-Colín, S. 1990. Identificación de las especies cultivadas del género *Phaseolus*. Colegio de Posgraduados. Montecillo, México. 20 p.
- Nabhan, G., J. Muruaga-Martinez and B. Burns. 1986. Wild bean exploration in northwest Mexico and the southwestern United States. *FAO/IBPGR Plant Genet. Resour. Newsl.* 65: 23-25.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583–590.

- Nei, M., and Li, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5256-5273.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 1996. Plan de Acción Mundial para la Conservación y Utilización Sostenible de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. Roma, Italia. 64 pp.
- Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Papa, R and Gepts, P. 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
- Paran, I., Michelmore, R. W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85: 985–999.
- Pavlicek, S. Hrda and J. Flegr. 1999. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biol.* 45: 97–99.
- Pedraza, F., Galleno, G., Beebe, S. and Tohme, J. 1997. Marcadores SCAR y RAPD para la resistencia a la bacteriosis común (CBB). *In: Singh, S.P., Voysest, O. (Eds.). Taller de Mejoramiento de Frijol para el Siglo XXI pp. 130-134 Bases para un una estrategia para America Latina. CIAT, Cali, Colombia.*
- Perdiere, G. and Gouy, M. 1996. WWW-Query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* 78: 364-369.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafel, M., Vogel, J., Tingey., S. and Rafalski, A. 1996. The comparison of RFLP, RADP, AFLP and SSR (microsatellites) marker for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2: 225-238.
- Pritchard, J., M. Stephens, and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Rao, R. and K.W. Riley. 1994. The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Genet. Resour. Newsl.* 97: 3-20.
- Rodiño, A. P., Santalla, M., De Ron, A. M. and Singh, S. P. 2003. A core collection of common bean from the Iberic peninsula. *Euphytica* 131: 165-175.
- Rodríguez-Guerra, R., Acosta-Gallegos, J. A., González-Chavira, M. M. Simpson, J. 2006. Patptipos de *Colletotrichum lindemuthianum* y su implicación en la generación de cultivares resistentes de frijol. *Agric. Téc. Méx.* 32: 101-114.

- Rodrigo-Míguez, A. P. 2000. Caracterización morfoagronómica y bioquímica de germoplasma de judía común (*Pasheolus vulgaris* L.) en España. Tesis de Doctorado. Universidad de Santiago de Compostela. Pontevedra, España. 214 p.
- Schneider, S., Kueffer, J. M., Roessli, D., and Excoffier, L. 1997. Arlequin version 1.1: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- Secretaria de Agricultura, Ganadera, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2008. en línea en: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx> Fecha de consulta 25 de enero de 2010.
- Serrano, J. y Goñi, I. 2004. Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. Arch. Lat. Nutr. 54: 36-44.
- Smith, B. D. 2005. Reassessing Coxcatlan Cave and the early history of domesticated plants in Mesoamerica. Proc. of the Nat. Acad. Sci. (USA) 102: 9438-9445.
- Singh, S. P. 1999. Production and utilization. In. Singh, S. P. (Ed.). Common Bean Improvement in the Twenty-First Century. Kluwer Academic Publisher. pp. 1-24.
- Singh, S. P., Gepts, P., Debouck, D. G. 1991a. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). Econ. Bot. 45: 379-396.
- Singh, S. P., Gutierrez, J. A., Molina A., Urrea, C. and Gepts, P. 1991b. Genetic diversity in cultivated common bean: II. marker-based analysis of morphological and agronomic traits. Crop. Sci. 31: 23-29.
- Shong, L. S. 1990. Alteracoes na lixiviacao electrolitica, germinacao e vigor da semente de feijao envelhecida sob alta umidade relativa do ar e alta temperatura. Rev. Bras. Fisiol. Veg. 2: 1-6.
- StatSoft, Inc. 2004. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Version 7.0 Tulsa, OK. USA.
- Triana, B., M. Iwanaga, H. Rubiano and M. Andrade, 1993. A study of allogamy in wild *Phaseolus vulgaris*. Bean Improv. Coop. 36: 20–21.
- Vargas-Vázquez, M. L. P., Muruaga-Martínez, J. S., Acosta-Gallegos, J. A., Navarrete-Maya, R., Pérez-Herrera, P., Esquivel-Esquivel, G., Irizar-Garza, M. B. G. y Hernández-Castillas. 2006. Colección núcleo de *P. vulgaris*. L. del INIFAP. 461 p.
- Vargas-Vázquez, M. L. P., Muruaga-Martínez, J. S., Pérez-Herrera, P., Gill-Langarica, H R., Esquivel-Esquivel, G., Martínez-Damián, M A, Rosales-Serna, R. y Mayek-Pérez, N. 2008. Caracterización morfoagronómica de la colección núcleo de la forma cultivada de frijol común del INIFAP. Agrociencia 42: 787-797.

- Vásquez-Arroyo, J., Sessitsch, A., Martínez, E., and Peña-Cabriales, J. J. 1998. Nitrogen fixation and nodule occupancy by native strains of *Rhizobium* on different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* 204: 147–154.
- Vidigal Filho, P. S., Gonçalves-Vidigal, M. C., Medeiros, A. F. and Vidigal, P. G. 2006: Characterization of the anthracnose resistance genes in Andean common bean Jalo Listras Pretas cultivar. *Bean Improv. Coop.* 49: 35-36.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids. Res.* 23: 4407-4414.
- Voyses, O. and Dessert, M. 1991. Bean cultivars: Classes and commercial seed types. *In: Schoonhoven, A. V. and Voyses, O. (eds). Common Bean: Research for Crop improvement.* Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. p. 124.
- Voyses, V.O. 2000. Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): legado de variedades de América Latina 1930-1999. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 195 p.
- Wu, K. S., Jones, R., Danneberger, L., Scolnik, P. 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucl. Acids Res.* 22: 3257–3258.
- Yin, X., Stam, P., Dourleijn, C. J., Kropff, M. J. 1999. AFLP mapping of quantitative trait loci for yield-determining physiological characters in spring barley. *Theor. Appl. Genet.* 99: 244–253.
- Young, R. A., Melotto, M., Nodari, R. O. and Kelly, J. D. 1998. Marker assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in common bean cultivars G 2333. *Theor. Appl. Genet.* 96: 87-94.
- Yu, K., Park, S. J. and Poysa, V. 2000. Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficacy and economics. *Plant Breed.* 119: 411-415.
- Zizumbo-Villarreal, D., Colunga-GarcíaMarín, P., Cruz, E. P., Delgado-Valerio, P. and Gepts, P. 2005. Population structure and evolutionary dynamics of wild–weedy–domesticated complexes of common bean in a Mesoamerican region. *Crop Sci.* 45: 1073-1083.

## XII. GLOSARIO

Alelo= Forma alternativa de un gen.

Buffer= Solución amortiguadora.

Dendrograma= Representación grafica de datos en forma de árbol, organizados en subcategorias que se van dividiendo en otras hasta llegar al nivel de detalle deseado.

Diversidad= Diferencia o variedad entre las características de un conjunto o entre los de una misma clase.

*EcoRI*= Enzima de restricción de *Escherichia coli* que corta el ADN dentro de cada una de las cadenas de forma palíndrome (5'...GAATTC...3').

Fenotipo= Atributos observables de un organismo.

Germoplasma= Material que se conserva como semilla, cultivo de tejidos o plantas establecidas en colecciones de campo. Pueden definirse también como la variabilidad genética intraespecífica o como el material genético que pueden perpetuar una especie.

Heterocigoto= Organismo diploide o poliploide con alelos distintos en un *locus* dado.

Homocigoto= Organismo diploide o poliploide con alelos idénticos en un *locus* dado.

*Locus*= Posición de un gen en un cromosoma. Plural *loci*.

*MseI*= Enzima de restricción derivada de *Micrococcus species* que cortan el ADN dentro de cada una de las cadenas de forma palíndrome (5'...TTAA...3').

Marcador= Locus o alelo cuyo fenotipo proporciona información acerca de un cromosoma o segmento cromosómico durante el análisis genético.

Población= Grupo de organismos de la misma especie relativamente aislados de otros grupos de la misma especie.

Poliploide= Organismo con más de dos juegos de cromosomas.

Recombinación= ordenaciones alélicas no parentales en la descendencia resultante de los sucesos independientes o de entrecruzamientos.

RNAsa= Enzima ribonucleasa que actúa degradando al ARN.

Taq ADN Polimerasa= Enzima proveniente de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* que sintetiza desoxirribonucleótidos con una reducida o nula actividad exonucleasa 3'-5' o 5'-3'.

T<sub>4</sub> ADN Ligasa= Enzima del bacteriófago T<sub>4</sub> que liga fragmentos de ADN.

*Tru9I*= enzima de restricción derivada de *Thermus rubus*, isoezquisómero de *MseI*, de corte palíndromo en el ADN (5'...TTAA...3').