

2005 B - 2010 A

302102692

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



RELACIONES GENÉTICAS ENTRE FORMAS SILVESTRES, CULTIVADAS E INTERMEDIAS DE FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) DEL OCCIDENTE DE MÉXICO BASADAS EN ISTRs

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE  
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

GUILLERMO EDUARDO CASTELLANOS ENRIQUEZ

Las Agujas, Zapopan, Jal., Marzo de 2011



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

*Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología*

COORD-BIO-137/2010.

C. GUILLERMO EDUARDO CASTELLANOS ENRIQUEZ  
PRESENTE

Manifiestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS E INFORMES opción TESIS con el título: "Relaciones genéticas entre formas silvestres, cultivadas e intermedias de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) del occidente de México basadas en ISTRs" para obtener la Licenciatura en Biología

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo a la Dra. Martha Isabel Torres Morán y como asesor al Dr. Rogelio Lépiz Ildefonso y Dra. Anne Marguarite Helene Santerre.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"

"2010 Bicentenario de la Independencia y Centenario de la Revolución Mexicana"  
Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 16 de noviembre del 2010.

DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

N.C. GLORIA PARADA BARRERA  
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.  
 Presidente del Comité de Titulación.  
 Licenciatura en Biología.  
 CUCBA.  
 Presente.

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad tesis, con el título: "Relaciones genéticas entre formas silvestres, cultivadas e intermedias de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) del occidente de México basadas en ISTRs" que realizó el pasante Guillermo Eduardo Castellanos Enriquez con número de código 302102692, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

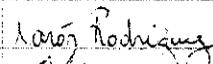
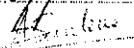
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

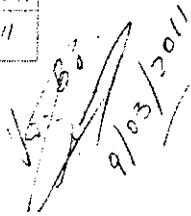
Atentamente  
 Las Agujas, Zapopan, Jal., 07 de Marzo de 2011

  
 Martha Isabel Torres Morán  
 Director

  
 Rogelio Lépiz Idefonso  
 Asesor

  
 Anne Marguerite Helene Santerre  
 Asesora

Nombre completo de los Síndacos avanzados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Aarón Rodríguez Contreras		Marzo 8, 2011
Ofelia Vargas Ponce		Marzo 8, 2011
Anne Marguerite Helene Santerre		Marzo 8, 2011

  
 9/03/2011

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Marcadores Moleculares perteneciente al Instituto de Manejo y Aprovechamiento de Recursos Fitogenéticos (IMAREFI) del Departamento de Producción Agrícola, División de Ciencias Agropecuarias, con el apoyo financiero del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI) a través del Proyecto de Frijol BEI-FRI-09 año operativo 2009-2010.

## Agradecimientos

*La naturaleza está constituida de tal manera que es experimentalmente imposible determinar sus movimientos absolutos.*  
**Albert Einstein**

Por orden de aparición.

A mis padres Conchita y Guillermo, por su paciencia, cariño, dedicación y apoyo incondicional desde mi nacimiento hasta esta importante etapa de mi vida, y por su valiosa aportación para mi formación como ser humano.

A mis hermanas Aurora y Julieta, por que sin su apoyo y compañía el camino sería más difícil, y por el afecto que me han brindado todos estos años.

A mis amigos y amigas, por ser el complemento ideal a todo lo demás.

A mi directora de tesis Martha Isabel Torres Morán por su entusiasmo, dedicación, paciencia y apoyo durante la larga jornada del trabajo de tesis y por su calidez como ser humano.

A ciertos maestros del CUCBA que por falta de espacio no menciono, por su participación en mi formación profesional como biólogo, por haberme enseñado a tener una visión amplia y a sentir una pasión por la biología.

A mis compañeros de laboratorio, por hacer ameno el trabajo y por la ayuda y consejos brindados en múltiples ocasiones.

A mis asesores por las sugerencias y apoyo brindado para la culminación de este trabajo.

A mis sinodales por sus valiosas aportaciones y oportunos comentarios para mejorar el presente trabajo.

## Contenido

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN .....	2
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Los recursos fitogenéticos: importancia y perspectivas para su conservación .....	4
2.2 El valor del frijol común como recurso fitogenético en México.....	10
2.3 <i>Phaseolus vulgaris</i> L. : un complejo reservorio de variación genética.....	15
2.4 Herramientas moleculares para detectar variación genética.....	17
2.5 Retrotransposones como marcadores moleculares.....	21
2.6 ISTRs (Inverse Sequence-Tagged Repeat) .....	23
2.7 Antecedentes del estudio de la variabilidad en frijol común .....	24
III. JUSTIFICACIÓN.....	27
3.1 Hipótesis.....	28
3.2 Objetivo general.....	28
3.3 Objetivos particulares.....	28
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
4.1 Material vegetal.....	29
4.2 Extracción de ADN genómico.....	34
4.3 Amplificación .....	35
4.4 Análisis estadísticos .....	36
V. RESULTADOS.....	40
VI. DISCUSIÓN .....	47
VII. CONCLUSIONES.....	51
VIII. LITERATURA CITADA.....	53

## Índice de figuras

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Figura 1	Representación esquemática de la paradoja conservación desarrollo	8
Figura 2	Esquema de las estrategias complementarias para la conservación efectiva de los recursos fitogenéticos	10
Figura 3	Esquema de la clasificación de los elementos móviles	22
Figura 4	Muestras de semilla de las treinta poblaciones de frijol común estudiadas	30
Figura 5	Representación geográfica de los sitios de colecta de las poblaciones de frijol común estudiadas	31
Figura 6	Semillas de las poblaciones cultivadas y silvestres de frijol común estudiadas	32
Figura 7	Semillas de las poblaciones intermedias de frijol común utilizadas	34
Figura 8	Patrones de amplificación con la combinación de iniciadores F91/B31	40
Figura 9	Dendrograma obtenido por el análisis de agrupamiento para las poblaciones bajo estudio	42
Figura 10	Representación gráfica del análisis con el programa STRUCTURE	45

## Índice de cuadros

<b>Cuadro</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Cuadro 1	Causas y factores de la erosión genética en los recursos fitogenéticos	7
Cuadro 2	Rasgos de color de la semilla, información de sitio de colecta, forma y nomenclatura de las poblaciones de frijol común estudiadas	33
Cuadro 3	Secuencia de los iniciadores utilizados	36
Cuadro 4	Número de bandas polimórficas y porcentaje de polimorfismo detectado con dos combinaciones de iniciadores ISTR en las poblaciones de frijol común estudiadas	41
Cuadro 5	Valores de diferenciación genética ( $F_{st}$ ) obtenidos para los valores de K (1 - 9) sugeridos por el programa STRUCTURE	44

## RESUMEN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) representa un recurso fitogenético de gran importancia debido a su historia evolutiva que lo liga al hombre, y a su alta variación genética que lo ha constituido como un cultivo de amplia distribución. Dicha variabilidad se encuentra bien representada en el occidente de México. Este sitio ha sido señalado como parte del centro mesoamericano de diversidad y domesticación del frijol. El objetivo del presente trabajo fue determinar las relaciones genéticas entre las diferentes formas de frijol común (silvestres – intermedias y cultivadas) a través del uso de herramientas moleculares, en particular utilizando marcadores ISTRs. Para ello, se utilizaron trescientos individuos de frijol común pertenecientes a treinta poblaciones colectadas en el occidente de México. Se encontró que las diferentes formas de frijol común constituyen un grupo heterogéneo en el que existen evidencias de que las poblaciones intermedias se presentan como producto de la hibridación entre las formas cultivadas y silvestres. Las accesiones cultivadas se mantuvieron separadas de las silvestres. El marcador ISTR resultó útil para generar información valiosa en la estimación de la estructura genética de las poblaciones de frijol común. Los datos generados proporcionan información preliminar para la planeación de estudios que involucren procesos como domesticación, flujo génico y diversidad genética.

## I. INTRODUCCIÓN

Los recursos fitogenéticos son el conjunto de especies vegetales de valor antropocéntrico actual o potencial, forman parte importante de los ecosistemas y han sido la base de la evolución, desarrollo y bienestar de la humanidad. La comprensión de la base molecular de los fenómenos biológicos esenciales en las plantas es crucial para la conservación efectiva, manejo y utilización eficiente de los recursos fitogenéticos (Mondini, 2009). Entre las acciones que deben llevarse a cabo para la preservación, manejo y utilización de los recursos fitogenéticos, se encuentra la caracterización y el conocimiento de la estructura genética de las poblaciones, herramientas que auxilian para describir la diversidad genética inter e intrapoblacional y que ofrecen un marco teórico para entender los cambios evolutivos y la variación en los patrones genéticos de las poblaciones (Sosa y cols. 2002).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) constituye una especie que ha acompañado al hombre durante miles de años y que contiene un alto grado de variación genética, lo que hace de ésta especie un recurso fitogenético con alto valor adaptativo. El estudio de dicha diversidad es esencial para diseñar estrategias que garanticen su efectiva conservación y utilización, tanto de la forma cultivada, como de sus parientes silvestres. Los trabajos de exploración y coleccion del frijol silvestre, han reportado la existencia de una tercera forma de este taxón, con características morfológicas intermedias entre las variedades cultivadas y la forma silvestre (López y cols. 2010). El conjunto de formas

silvestres, cultivadas e intermedias (weedy forms) de *Phaseolus vulgaris* constituye un acervo genético que debe ser estudiado con detalle en todos los niveles posibles (genes, población – especie, comunidad – ecosistemas y paisaje), y que representan un complejo mosaico de interacciones a través del tiempo en el que el hombre ha jugado un papel determinante.

El estudio en frijol común mediante el uso de marcadores moleculares comenzó en la década de 1980, se ha enfocado al conocimiento de la diversidad genética para investigación básica como aplicada, y ha llevado a la comprensión de procesos que involucran su origen, domesticación y flujo génico. Se ha señalado la necesidad de enfoques multidisciplinarios en este tipo de estudios para identificar qué debe conservarse, cómo se puede conservar de la mejor manera y cómo los materiales conservados pueden ser mejor usados (Hodgkin y Rao, 2002). Sin embargo no siempre es posible lograr enfoques multidisciplinarios, por lo que la acumulación y comparación de diversos estudios son de gran valor para los fines mencionados.

Dado que el Occidente de México es parte del centro mesoamericano de diversidad y domesticación del frijol común y es una región que alberga alta variabilidad genética de frijol común, en el presente trabajo se pretende detectar las relaciones genéticas entre poblaciones con diferente forma provenientes del Occidente de México utilizando el marcador molecular ISTR.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Los recursos fitogenéticos: importancia y perspectivas para su conservación

Los recursos fitogenéticos son definidos por el Tratado Internacional de Recursos Fitogenéticos (ITPGRFA por sus siglas en inglés: International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture) como cualquier material genético de origen vegetal con un valor actual o potencial para la alimentación y la agricultura y que puede pertenecer a las siguientes categorías de plantas: variedades cultivadas de uso actual y variedades desarrolladas recientemente, cultivares obsoletos, cultivares primitivos, parientes silvestres y malezas (forma intermedia o weedy form) o líneas especiales. De manera más concreta Ayad (1980) define a los recursos fitogenéticos como la variabilidad genética potencialmente útil en la agronomía, presente en las plantas cultivadas así como en las especies silvestres relacionadas. Los recursos fitogenéticos forman parte del complejo al que se le ha llamado recientemente como agrobiodiversidad, la cual incluye todos los tipos de cultivos y bienes semovientes, parientes silvestres y especies que interactúan con ellos como polinizadores, simbioses, plagas, parásitos, depredadores y competidores (Qualset y cols. 1995).

Estos recursos 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

presente y futura de la población humana (Martín-Martínez, 2005). Todos los países del mundo tienen una interdependencia de los recursos fitogenéticos basada en dos hechos. El primero tiene que ver en que en todos los países se cultivan no sólo especies nativas, sino un buen número de especies introducidas. El segundo punto es la existencia de cultivos que son fuentes universales de alimentos, como por ejemplo el trigo o el arroz. Estas especies pueden ser cultivadas en un país determinado, o pueden ser importadas parcial o totalmente de otro. Lo anterior hace evidente la existencia de la interdependencia mundial para el desarrollo de nuevos cultivares a través del mejoramiento genético, como en la producción de alimentos y productos de origen vegetal (Lépiz y Rodríguez, 2006). Esto hace visible la importancia de planificar estrategias que logren la preservación de los recursos fitogenéticos de una manera adecuada y sostenible.

Otorgar valor a los recursos fitogenéticos es una tarea compleja. El describir los tipos de beneficios asociados con estos recursos es más sencillo (Rubenstein y cols. 2009); sin embargo el reconocimiento de los valores totales asociados es una tarea indispensable para el conocimiento, valoración y conservación de los recursos fitogenéticos.

Los recursos fitogenéticos tienen diferentes clases de valores económicos que los mercados fallan en capturar completamente. La clasificación convencional del valor económico total consiste en valores de uso y de no uso. Los valores de uso pueden ser directos o indirectos, reflejando la contribución del recurso a los hábitats que lo rodean o ecosistemas (Drucker y cols. 2005). El valor de uso

directo lo conforma el valor comercial del recurso fitogenético, mientras que los usos indirectos residen en los siguientes valores: sociocultural, de identidad, ecológico, nutricional y adaptativo. Tanto el valor directo como el indirecto tienen dimensiones presentes y futuras (esperadas). El valor de uso presente se deriva de la utilidad ganada por un individuo por el consumo de un bien o servicio mientras que el valor futuro esperado se basa en las probabilidades conocidas que pudiera otorgar el recurso. Los recursos fitogenéticos preservados que no están siendo usados constituyen el valor potencial, que es el valor asociado a la opción de explotar los recursos en el futuro, en este caso la demanda futura es incierta. Por último, el valor de no uso incluye el valor de existencia, reflejando la satisfacción del saber que el recurso existe, sin relacionarlo a ningún uso que pudiera tener el recurso; y también el valor de legado, que tiene que ver con la transmisión del recurso a futuras generaciones (Williams, 2010).

Los recursos fitogenéticos se ven amenazados por distintas causas que provocan la erosión genética de los mismos y que provienen tanto de cambios naturales como de presiones antropogénicas. Estas amenazas se mencionan en el Cuadro 1; sin embargo se ha señalado como la principal causa de la erosión genética de los recursos fitogenéticos a el reemplazo generalizado, desde los años 1950, de las variedades tradicionales por variedades con arreglos genéticos más homogéneos (Fraleigh, 2006). Las causas mencionadas son dinámicas, lo que significa que los niveles de amenaza a menudo cambian rápida e inesperadamente.

Actualmente, las agencias nacionales e internacionales se han visto forzadas a tratar con una paradoja básica que se basa en la confrontación que existe entre la conservación y el desarrollo de los recursos fitogenéticos.

Cuadro 1. Causas y factores de la erosión genética en los recursos fitogenéticos.

CAUSA	FACTORES
<b>Destrucción y fragmentación de ecosistemas naturales</b>	Construcción de caminos, expansión de pueblos y ciudades, industrialización, minería, remoción de comunidades vegetales cercanas para la producción agrícola intensiva
<b>Sobre explotación</b>	Extracción excesiva de plantas silvestres hortícolas, medicinales o con otros usos, sobrepastoreo, turismo sin control, etc.
<b>Introducción de especies exóticas</b>	Introducción de malezas, plagas y enfermedades que pueden competir, hibridar o depredar a las especies nativas.
<b>Cambios humanos socio-económicos</b>	Extinción de culturas nativas, hostilidades, escasez de alimentos, desmonte de tierras.
<b>Cambios en prácticas agrícolas y en uso de suelo</b>	Reemplazo o suplemento de variedades tradicionales de cultivos con variedades modernas y uniformes, cambios en los regímenes de pastoreo, incremento de uso de herbicidas y pesticidas (que afecten polinizadores), drenaje de hábitat húmedos, quema, tala, etc.
<b>Desastres humanos</b>	Contaminación de aguas (incluyendo eutrofización), contaminación de aire, contaminación de suelos, etc.
<b>Calamidades naturales</b>	Inundaciones, deslaves, erosión del suelo, etc.

Tomado de Hawkes y cols. (2000).

Se puede representar la base de esta paradoja en la siguiente secuencia de eventos: los fitomejoradores de alrededor del mundo están comprometidos correctamente con el desarrollo de mejores y más productivos cultivos de plantas. Esto involucra el reemplazo de las variedades criollas que se siembran tradicionalmente o variedades locales, que son generalmente variables genéticamente y de baja producción, por los productos de la agricultura

moderna, los cuales son mucho más uniformes genéticamente. De esta manera la uniformidad reemplaza a la diversidad. Los mismos fitomejoradores son dependientes de la disponibilidad de la reserva de la diversidad genética para el éxito de su trabajo, y de esta manera causan inadvertidamente la erosión genética de la diversidad vegetal que ellos mismos necesitarán para el futuro (Hawkes y cols. 2000).

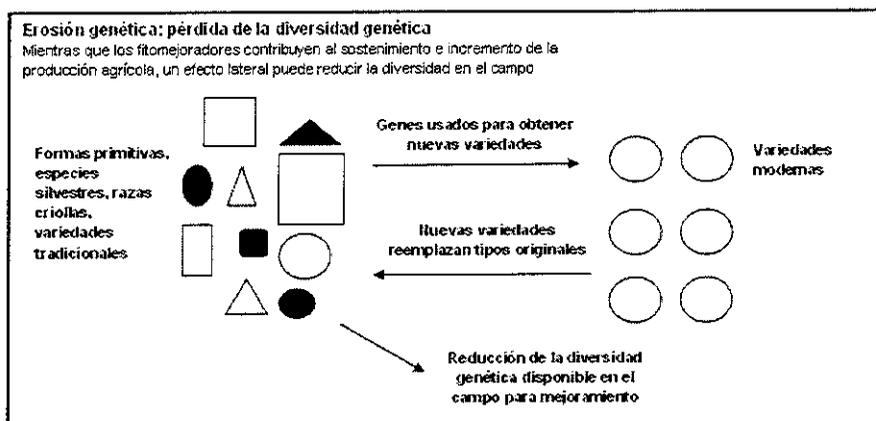


Figura 1. Representación esquemática de la paradoja conservación-desarrollo que involucra la reducción de la diversidad genética de los recursos fitogenéticos (basado en Hawkes y cols. 2000).

La comprensión de la base molecular de los fenómenos biológicos esenciales en las plantas es crucial para la conservación efectiva, manejo y utilización eficiente de los recursos fitogenéticos (Mondini, 2009). Entre las acciones que deben llevarse a cabo para el estudio y la conservación de los recursos fitogenéticos, se encuentra la caracterización y diferenciación genética de las poblaciones; ésta proporciona herramientas que describen la diversidad genética inter e intrapoblacional y ofrece un marco teórico para entender los

cambios evolutivos y la variación en los patrones genéticos de las poblaciones (Sosa y cols. 2002). Caracterizar los recursos fitogenéticos significa básicamente identificar y describir las diferencias existentes entre las accesiones, nombre genérico que se les da a las muestras de genotipos, variedades mejoradas, variedades criollas, especies silvestres y especies relacionadas con una determinada especie de interés que se resguardan en un banco de germoplasma (Chiorato y cols. 2006). Lo anterior es sólo una pequeña parte del proceso necesario para la evaluación, caracterización y conservación de la variación genética de los recursos fitogenéticos. Este tipo de trabajo requiere esquemas que incluyan planes de conservación *in-situ* y *ex-situ* que contengan una variedad de actividades, las cuales deben realizarse de manera complementaria. A continuación se ofrece un esquema propuesto por Maxted y cols. (1997) en donde se propone un modelo de estrategias complementarias para la conservación y utilización de los recursos fitogenéticos.

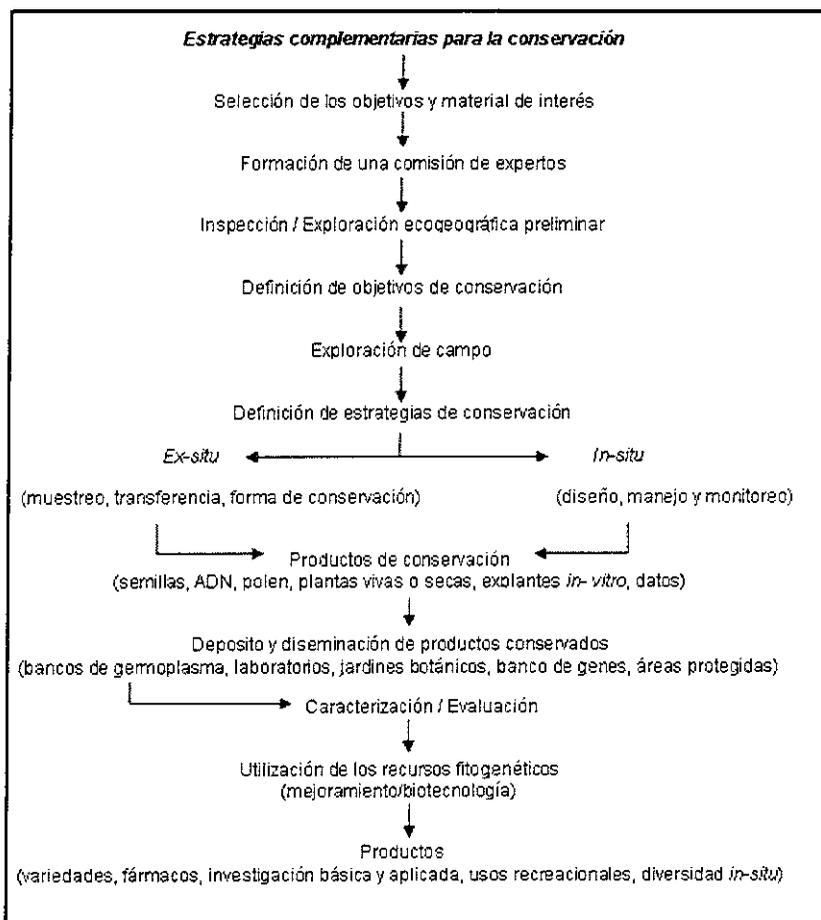


Figura 2. Esquema de las estrategias complementarias para la conservación efectiva de los recursos fitogenéticos propuesto por Maxted y cols. 1997.

## 2.2 El valor del frijol común como recurso fitogenético en México

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) es una legumbre ampliamente consumida en el mundo y constituye el cultivo que aporta la mayor fuente de proteína dietética en muchos países de América Latina y África. Además de su valor nutricional, el frijol ha sido reconocido como un alimento nutraceutico y

actualmente su consumo ha cobrado impulso en los países desarrollados donde la población se interesa cada vez más por dietas más saludables. Además de consumirse como semilla seca, parte de su producción se destina para consumo de vaina fresca (ejote), la cual aporta a la dieta del ser humano vitaminas y minerales que éste no sintetiza (Garduño-González y cols. 2009).

El frijol común como alimento, es una fuente importante de nutrimentos. En base de peso seco, en promedio contiene 24.7% de proteína, 69.4% de carbohidratos y 1.7% de lípidos; adicionalmente en 100 gramos de materia seca, aporta 136 mg de calcio, 9.4 mg de hierro, 0.42 mg de tiamina y 2.7 mg de niacina (Shellie y Bliss, 1991). La proteína de frijol es baja en contenido de aminoácidos azufrados, como cisteína y metionina, pero rica en lisina. Por otra parte, los granos de cereales como maíz, son deficientes en lisina. Por esta razón, el consumo de ambos productos en una dieta, resulta en un complemento y proporciona cantidades adecuadas de los aminoácidos esenciales (Lépiz y Ramírez, 2010).

En su rango de distribución, el frijol común coloniza múltiples y variados nichos ecológicos, usualmente en hábitats perturbados con vegetación secundaria (Delgado-Salinas y cols. 1988). En México, la forma silvestre de esta especie se encuentra distribuida desde el norte del estado de Chihuahua hasta el sur de Chiapas, a lo largo de la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental y el Eje Neovolcánico, entre los 800 y 2200 msnm; puede encontrarse en una variedad de ambientes con características contrastantes en cuanto a precipitación y altura sobre el nivel del mar, lo que sugiere que la adaptación a tal variedad de

nichos se encuentra fundamentada en la riqueza de la diversidad genética (López y cols. 2005; Acosta-Gallegos y cols. 2007; Lépiz y Ramírez, 2010). El período vegetativo del frijol común puede variar de 70 a más de 200 días, lo cual permite que actúe como un excelente cultivo rotacional y utilizarlo bajo una amplia gama de posibilidades de consumo. Así mismo Zizumbo y cols. (1985) señalan que la forma domesticada se puede encontrar cultivada bajo una variedad de agrosistemas que abarcan desde complejos mecanizados e irrigados con manejo intensivo hasta sistemas tradicionales con ayuda de tracción animal y humana, lo que muestra la variedad de adaptaciones que tiene la forma cultivada provocada por la selección humana. El concepto de forma se utiliza como categoría jerárquica dentro de una especie de acuerdo a la divergencia morfológica y genética, distribución ecogeográfica, posibilidades de hibridación y fertilidad de los híbridos y sus derivados. Las formas se distinguen de manera general en base a una sola o pocas características morfológicas notables, sus rangos geográficos son simpátricos, la divergencia genética está bajo control genético simple, la hibridación es común y los híbridos son completamente fértiles (Sánchez, 2006).

En base a las estadísticas de la FAO, el cultivo de frijol común en el mundo durante el año 2004 produjo más de 18 millones de toneladas, cantidad inimaginable para la mente del ser humano, en 101 países de los cinco continentes. Entre los países con una producción mayor a las 500,000 toneladas de frijol por año, México ocupa el quinto lugar. Dentro del país este cultivo ocupa el segundo lugar después del maíz, en superficie sembrada con

1,954,945 hectáreas en promedio (2000 - 2003), un número de productores primarios en promedio de 570 mil y una producción de 1,111,280 toneladas anuales (Lépiz y Ramírez, 2010), lo cual representa la segunda actividad agrícola más importante desde el punto de vista social (FIRA, 2001). La zona semiárida templada de las tierras elevadas, es la región ecológica donde la mayor superficie de frijol es sembrada en México (más del 70%). Los cultivos con un mayor valor económico han ido desplazando gradualmente a los frijoles en dicha región. Gracias a la versatilidad de los frijoles, éstos han continuado siendo la mejor opción de cultivo en esta área de lluvias escasas e irregulares (Gepts y Debouck. 1991).

El frijol común es un elemento fundamental en la dieta de la población mexicana, sobre todo para las clases más desprotegidas del país, ya que constituye la fuente principal de proteínas para dicho sector, siendo un alimento que no puede sustituirse con el consumo de algún otro. Adicionalmente, la importancia ancestral de su cultivo en el campo mexicano radica también en que forma parte de la cultura gastronómica de México, de ahí la amplia aceptación del producto en la cocina mexicana, por lo que posee una gran demanda a nivel nacional (SIAP, 2010).

Las propiedades del frijol como alimento nutracéutico o funcional se basan en evidencias del papel que desempeñan algunos componentes en la promoción de la salud, algunos de los cuales se describen a continuación. La fibra soluble del frijol es particularmente eficiente para disminuir los niveles de colesterol en la sangre, además se le ha relacionado con la prevención de problemas

cardiovasculares y en la reducción del cáncer de colon. Los compuestos polifenólicos del frijol común son señalados como posibles agentes para combatir el cáncer y arteriosclerosis, mientras que otros componentes del frijol pueden estar relacionados con la prevención y con la cura de algunas enfermedades del ser humano, como por ejemplo la lisina que favorece el metabolismo del hígado cuando éste sufre algún tipo de daño (Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1998). En cuanto a estudios nutricionales de frijol en México, se ha señalado la amplia variación en los compuestos polifenólicos encontrados en las formas silvestres e intermedias de frijol común provenientes de México (Espinoza-Alonso y cols. 2006), y el mayor contenido de proteína, calcio, hierro y zinc en comparación a las formas cultivadas (Guzmán-Maldonado y cols. 2000). Lo anterior demuestra la importancia y valor de dicha variación en las formas silvestres e intermedias para los programas de mejoramiento enfocados en nutrición y salud.

Con base a los valores mencionados anteriormente y la alta variabilidad de características que poseen las tres formas de frijol común, se puede corroborar la gran importancia y potencial que resguardan los recursos fitogenéticos de *Phaseolus vulgaris* en México, y resaltar la necesidad de profundizar en estudios que se enfoquen principalmente en la conservación y manejo del recurso.

### **2.3 *Phaseolus vulgaris* L. : un complejo reservorio de variación genética**

En un periodo de 7000 a 8000 años y con influencia de las fuerzas evolutivas de mutación, migración, deriva genética y selección empírica practicada por el hombre, el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) ha transitado desde la forma silvestre de hábito trepador y semillas pequeñas distribuido en las tierras altas de Mesoamérica y Zona Andina, a la forma actual que se siembra en un amplio rango de ambientes y sistemas de producción (Gepts y Debouck, 1991, Lépiz y cols. 2010). Una característica esencial de la evolución del frijol común como cultivo, puede ser la disminución gradual de la diversidad genética desde su domesticación hasta el presente (Gepts y Debouck, 1991).

En base a información y datos provenientes de diversas áreas del conocimiento como historia, arqueología, etnobotánica, geografía, genética, botánica y bioquímica, actualmente se reconoce que el género *Phaseolus* es de origen americano. Específicamente en frijol común se reconocen dos centro primarios de diversidad (Mesoamérica y Zona andina) con dos acervos genéticos respectivos (Mesoamericano y Andino) y con varios sitios probables de domesticación (Jalisco-Guanajuato en México y Guatemala en Mesoamérica y Ecuador y Perú en la Zona Andina). Los acervos o grupos genéticos, tienen características propias debidas a su relativo aislamiento geográfico y reproductivo, características que además de observarse en las formas silvestres, se mantienen en las formas domésticas cultivadas (Gepts y Debouck, 1991).

Con base a las relaciones entre las formas cultivadas y silvestres determinadas por el uso de marcadores bioquímicos y moleculares, a la fecha se acepta que la domesticación ocurrió en cada uno de los dos acervos genéticos ancestrales existentes, Mesoamericano (México hasta Colombia) y Andino (Perú hasta el norte de Argentina) (Gepts y cols. 1986, Chacón y cols. 2005, Kwak y Gepts, 2009). Según Kwak y cols. (2009), en Mesoamérica la domesticación del frijol común ocurrió en la cuenca del Río Lerma-Santiago de México. Estudios en la dinámica genética en los complejos cultivado-intermedio-silvestre dentro del área de domesticación en Mesoamérica son importantes, ya que cuatro de las cinco especies domesticadas y 45 de las 50 especies del género *Phaseolus* crecen en esta área, y sus relaciones reproductivas naturales son la mayoría desconocidas hasta el presente (Zizumbo y cols. 2005).

La forma silvestre de *P. vulgaris* es de hábito indeterminado trepador en la que predominan flores de color morado; las vainas son pequeñas y delgadas, dehiscentes y de semilla pequeña que presenta latencia, generalmente de color gris, ya sea uniformes o jaspeadas. Los cambios más notables ocurridos en la planta de frijol durante el proceso de domesticación se pueden resumir como: de tallo trepador a arbustivo; de folíolos pequeños a intermedios y grandes; de inflorescencia lateral a terminal; de semillas pequeñas de 6-14 g en 100 semillas a semillas pequeñas a grandes de 20-100 g en 100 semillas y de color gris uniforme a jaspeado a variedad de colores que incluyen negro, morado, amarillo, etc. (López y cols. 2010).

Dentro de la gran diversidad de frijol común, además de los frijoles silvestres y cultivados, existe un grupo intermedio llamado en inglés “weedy form” o “weedy type”, frecuentemente denominado como frijol tipo maleza o forma enmalezada, producto de la cruce entre frijoles silvestres y variedades domesticadas (López y cols. 2010). Dichas formas intermedias se consideran originadas por hibridación natural entre las poblaciones domesticadas y silvestres, cruzamiento natural y flujo genético que puede ocurrir en los sitios donde coexisten (Deboucq y cols. 1993 y Zizumbo y cols. 2005). El flujo genético representa un potencial para incrementar la variabilidad genética y las posibilidades de mejoramiento de las formas cultivadas.

La variabilidad en el hábito de crecimiento y el tipo de semilla en los frijoles cultivados refleja las consecuencias de la alta diversidad inducida por los humanos. Pero el aparente incremento en la variabilidad de los caracteres morfológicos de la forma cultivada bajo la presión de la domesticación puede no ser característico de la variabilidad del genoma completo. Las características moleculares, que no son visibles ni modificadas por la selección humana, pueden proyectar una imagen diferente y más apropiada del destino de la diversidad genética en los procesos de domesticación y evolución.

#### **2.4 Herramientas moleculares para detectar variación genética**

Para evitar conflicto de términos, en el presente trabajo las palabras variación y variabilidad, refiriéndose al campo genético, se usan como sinónimos, ya que para el autor del presente trabajo estos términos contrastan en un mínimo grado

lingüísticamente y están íntimamente relacionados, aunque para algunos autores (Wagner, 1995; Allem, 2000) sean conceptos muy distintos. Estos términos se refieren al grado de variación genética heredable existente en una población o especie, como consecuencia de los procesos evolutivos y factores ambientales a los que se ha visto sometida (Sánchez, 2006).

La variación genética está presente, de alguna forma, en las poblaciones naturales de todos los organismos. Esta variación es particularmente notoria cuando se consideran especies que han sido seleccionadas artificialmente por el hombre, y se expresa en el fenotipo y genotipo de los organismos. La habilidad de las especies para responder a la selección es dependiente de la presencia de variación heredable. Si la variación genética está presente dentro de una especie, ésta permitirá que algunos individuos sobrevivan a las alteraciones en las presiones selectivas debidas a cambios ambientales. Por lo tanto, la ausencia de variación genética podría resultar en la falta de capacidad adaptativa en las especies para responder a perturbaciones ambientales, lo cual llevaría finalmente a la extinción. La variación genética dentro de las especies tiene tres componentes: (i) diversidad genética (cantidad de variación) (ii) diferenciación genética (distribución de la variación genética entre poblaciones) y (iii) distancias genéticas (la cantidad de variación genética entre pares de poblaciones) (Lowe y cols. 2004).

Los caracteres morfológicos usados para la caracterización y estimación de la variación genética pueden ser de utilidad limitada debido a que están influenciados por el ambiente y el estado de desarrollo de la planta. Por el

contrario, las isoenzimas o los marcadores de ADN que son poco o nada influenciados por el ambiente, son por consiguiente más adecuados para las caracterizaciones del germoplasma (Tatieni y cols. 1996). Las diferencias que distinguen a una planta de otra están codificadas en el material genético, el ácido desoxirribonucleico (ADN). Los marcadores moleculares o marcadores de ADN, revelan sitios de variación naturales a nivel de secuencia de ADN. A diferencia de los marcadores controlados por genes asociados a caracteres morfológicos (fenotipos de fácil identificación visual), las variaciones en los marcadores de ADN no se muestran por sí mismas en el fenotipo, porque pueden ser diferenciadas en un solo nucleótido del gen o un segmento de ADN repetitivo (Mosquera, 2005). Estos marcadores no se deben de considerar como genes normales, pues usualmente no tienen ningún efecto biológico y en su lugar pueden ser considerados como marcas constantes en el genoma (Semagn y cols. 2006). De esta manera, un marcador molecular es en esencia una secuencia nucleotídica correspondiente a una localización física en el genoma; su secuencia necesita ser suficientemente polimórfica entre accesiones de plantas para permitir que su patrón de herencia se pueda seguir fácilmente (Schulman, 2007).

Los marcadores moleculares relacionados a una característica específica son de particular interés porque permiten identificar individuos que contienen esa característica y diferenciarlos de los que no la posean, es decir, dan información sobre la variación genética. Lo anterior representa un aspecto esencial de investigaciones y aplicaciones en diversos campos de la biología tanto aplicada

como fundamental: biología evolutiva, ecología, taxonomía, agronomía, biotecnología, microbiología, entre otros (Mosquera, 2005).

Inicialmente los niveles de diversidad y organización de la diversidad genética (estructura) en las plantas fueron estimados con diversos tipos de marcadores moleculares. La mayoría de estos análisis fueron diseñados para comprender la organización de la diversidad en las especies. La diversidad presente en cultivos de importancia mundial es ahora una de las que mejor se conoce (Gepts y cols. 2008).

El uso de los marcadores moleculares en análisis genéticos y en el mejoramiento de las plantas ha tenido una difusión extremadamente rápida. Las principales aplicaciones incluyen la obtención de huellas genéticas (fingerprinting) de individuos, variedades y poblaciones; el análisis de la estructura y diversidad genética en poblaciones naturales, variedades mejoradas y accesiones de bancos de germoplasma; el establecimiento de relaciones filogenéticas entre individuos y especies; la construcción de mapas genéticos de alta cobertura genómica y la localización de genes de interés económico; mapeo de características de herencia cuantitativa y selección auxiliada por marcadores (Solís-Ramos y Andrade-Torres, 2005). La elección del método adecuado depende del objetivo del estudio así como de la disponibilidad de recursos económicos y los estudios realizados anteriormente en la especie de interés.

## **2.5 Retrotransposones como marcadores moleculares**

Las secuencias interespecíficas repetitivas comprenden una larga fracción del genoma de muchos organismos eucariontes y consisten predominantemente de elementos transponibles (TEs) (Kalendar y cols. 2010).

Los elementos transponibles se dividen en dos clases principales. Los transposones clase II, que se mueven por un mecanismo de corte-pegado como una doble cadena de ADN. De acuerdo a Graur y Li (2000), según las clases de genes que contienen estos se dividen en: a) secuencias de inserción, son los más sencillos, no contienen otra información más que la necesaria para la transposición, b) transposones que contienen genes exógenos (genes que codifican para funciones diferentes relacionadas a la transposición, en bacterias por ejemplo, confieren resistencia a antibióticos, y c) transposones compuestos, formado por dos secuencias de inserción con transposición independiente, en cualquier orientación, flanqueando genes exógenos. En contraste, los transposones de clase I se transponen a través de un ARN inmediato empleando la enzima transcriptasa inversa para su movilidad, y así la copia original permanece en el genoma (Finnegan, 1989). Los elementos de clase I incluyen retrotransposones de repeticiones terminales largas (LINES) y retrotransposones esparcidos largos y cortos (SINES). Los retrotransposones de repeticiones terminales largas están entre los elementos más abundantes en los genomas vegetales (Pearce y cols. 1996).

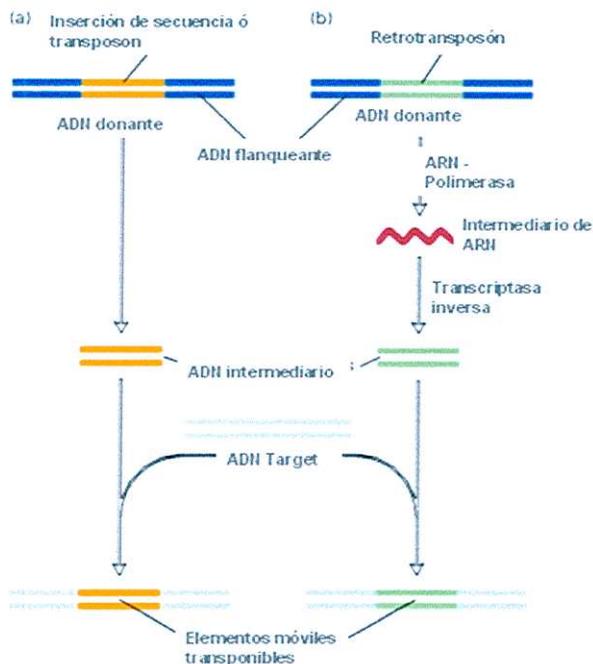


Figura 3. Esquema de la clasificación de los elementos móviles. a) elementos clase II; b) elementos clase I (Lodish y cols. 2000).

Como en otros sistemas de marcaje molecular, el surgimiento de los métodos basados en retrotransposones siguió a la investigación básica que demostró su ubicuidad, abundancia y actividad en las plantas (Schulman, 2007). Los retrotransposones son generalmente la mayor clase de ADN repetitivo en el genoma de las plantas, comprendiendo un rango de 40 al 60 % del ADN total, aunque este porcentaje varía dependiendo la especie de la que se trate. Más que escapar del genoma para infectar nuevos individuos como lo hacen los retrovirus, los retrotransposones insertan las nuevas copias solamente en el genoma de sus hospederos. Si la integración toma lugar dentro de las células

que dan origen al polen o a células embrionarias, entonces las nuevas copias son útiles para distinguir líneas cultivadas, variedades o poblaciones de plantas de otras (Schulman, 2007). Diferentes tipos de elementos TEs parecen estar presentes en todas las especies de plantas, pero los arreglos genómicos y las alteraciones estructurales y regulatorias de la expresión de genes individuales que ocasionan son muy variables aún en taxa muy relacionados (Bennetzen, 2000).

Los elementos móviles han modificado el genoma de los organismos a través del tiempo de diversas maneras, debido a que sus hospederos no pueden controlar el movimiento de estos elementos, la expansión de los retrotransposones ha sido acumulativa dentro de la evolución de las especies. En la actualidad, estos elementos se han convertido en una herramienta útil para el estudio de los genomas y su evolución (Kazazian, 2004).

## **2.6 ISTRs (Inverse Sequence-Tagged Repeat)**

A partir de los elementos transponibles se han desarrollado diferentes técnicas de marcaje de ADN, dentro de las cuales se encuentran los ISTRs, marcadores con los cuales se trabajó en el presente estudio. La técnica ISTR está basada en la detección del polimorfismo asociado a la inserción de retrotransposones en el genoma, lo que crea conexiones nuevas entre el ADN genómico y las secuencias altamente específicas que se encuentran limitando en ambos extremos a esos elementos transponibles, los cuales para insertarse en el

genoma requieren la síntesis de una molécula de ADN a partir de una de ARN, que sirve de molde (Lightbourn y Villeux, 2003).

Los marcadores ISTRs son marcadores moleculares que se detectan por PCR. Presentan una serie de ventajas con respecto a otros marcadores moleculares que los hace atractivos para la caracterización genética de plantas: utilizan iniciadores universales, no es necesaria la radioactividad para su visualización, amplifican un gran número de loci (5 a 100), detectan un polimorfismo considerable, son altamente reproducibles, no requieren gran cantidad ni alta calidad de ADN y se aplican en un amplio espectro de organismos (Lightbourn y Villeux, 2003). Las aplicaciones prácticas de los ISTRs están reportadas para varios fines y pueden ir desde determinación general de biodiversidad; caracterización de especies silvestres; estudios sobre genética de poblaciones; seguimiento de la introgresión de genes; huellas genéticas; hasta estudios de taxonomía sistemática y selección asistida (Rohde, 1996; Osorio y cols. 2006).

## **2.7 Antecedentes del estudio de la variabilidad en frijol común**

Los marcadores moleculares han sido usados en frijol común para: identificar y confirmar la existencia de dos complejos genéticos ancestrales existentes (Mesoamericano y Andino), previamente reportados por Gepts y cols. (1986). Para identificar y confirmar la existencia de razas ecogeográficas entre los frijoles domesticados en cada una de los acervos genéticos. Para evaluar los diferentes niveles de diversidad genética en materiales de la zona Andina y de la región Mesoamericana. Para documentar la importancia del flujo genético

entre las poblaciones domesticadas y silvestres (Papa y Gepts, 2003; Payró de la Cruz y cols. 2005; Zizumbo-Villarreal y cols. 2005). Para probar la eficacia de ciertos marcadores para mapeo génico, identificación de genotipos y selección asistida (Freyre y cols. 1998; Yu y cols. 2000; Kelly y cols. 2003), y para analizar la estructura genética de poblaciones (Kwak y Gepts, 2009; Asfaw y cols. 2009).

En los estudios moleculares del frijol común se han usado isoenzimas, proteínas de semilla, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), microsatélites y secuencias repetidas inter-simples ISSRs (McLean y cols. 2004 ).

En cuanto a los estudios que comparan las poblaciones silvestres, cultivadas e intermedias de frijol en ambos acervos genéticos, Papa y Gepts (2003) mediante marcadores moleculares confirmaron que existe flujo genético entre las dos formas principales de frijol común y que los frijoles intermedios son más cercanos a la forma silvestre. Al analizar las características morfológicas de formas cultivadas, intermedias y silvestres de frijol común, Lépiz y cols. (2010) encontraron que las formas se separan en tres grupos diferentes donde los de tipo intermedio forman un grupo morfológicamente más cercano a las poblaciones silvestres. Beebe y cols. (1997) señalaron la importancia de los complejos cultivados-silvestres-intermedios en Sudamérica para generar variabilidad genética y confirmaron intercambio genético en estos complejos basándose en análisis de proteínas de semilla (faseolina). Sugirieron que

dichos complejos han experimentado una larga evolución y que su conservación depende de la existencia de las formas en proximidad cercana y de la voluntad del agricultor por permitir a las formas intermedias crecer en las cercanías a los campos de cultivo.

Gepts y Debouck (1991) sugieren la necesidad de más estudios de marcadores moleculares asociados a marcadores agronómicos pues serían especialmente útiles para la evaluación de germoplasma y programas de mejoramiento. El factor limitante para ampliar los estudios moleculares y sus aplicaciones para el mejoramiento del frijol es claramente la falta de disponibilidad de más marcadores que sean: basados en PCR, altamente polimórficos y reproducibles (Acosta-Gallegos y cols. 2007). El occidente de México es una zona que presenta una importante variación en las formas de frijol común, por lo que es necesario realizar estudios que abarquen aspectos genéticos para conocer la estructura y distribución de la variación genética entre y dentro de las poblaciones. No se encontraron estudios en frijol común usando repeticiones de secuencias etiquetadas o ISTRs, por lo que el presente trabajo podría constituir una aportación valiosa como base para posteriores estudios usando los mencionados marcadores.

### III. JUSTIFICACIÓN

Las poblaciones de frijol común se encuentran expuestas a diversas presiones que atentan en contra de la variabilidad, como la uniformidad de las variedades comerciales desarrolladas a partir de una línea pura. Algunas poblaciones de frijol silvestre han desaparecido por completo y en otras se ha reducido significativamente el número de individuos, causa que ha reducido la variación genética de las distintas formas de la especie (cultivada, silvestre e intermedia) (Rosales, 2009). En México la forma cultivada de ésta leguminosa se enfrenta a modificaciones importantes ante una sociedad cambiante en hábitos alimenticios, donde los consumidores demandan sólo ciertos tipos altamente uniformes. Es necesario un estudio más sistematizado de la diversidad genética y las diferencias genéticas entre las formas cultivadas, intermedias y silvestres, para que se conduzca a un mejor uso y manejo de los recursos genéticos del frijol común y a una optimización en los programas de mejoramiento.

La importancia de este estudio radica en la posibilidad de caracterizar y diferenciar a través del uso de herramientas moleculares las diferentes formas de frijol común provenientes del occidente de México, trabajo que permitiría definir sus diferencias y similitudes genéticas generando información valiosa para la caracterización de la variabilidad de este recurso fitogenético así como en la obtención de datos genéticos importantes para el diseño de planes de conservación y mejoramiento.

### **3.1 Hipótesis**

En el occidente de México, las poblaciones cultivadas, intermedias y silvestres de frijol común constituyen grupos genéticos diferentes.

La variación genética detectable por los marcadores ISTRs es capaz de establecer relaciones genéticas entre poblaciones silvestres, intermedias y cultivadas de frijol común.

La estructura genética de las poblaciones detectadas en frijol común es un indicador de la heterogeneidad de las mismas.

### **3.2 Objetivo general**

Detectar las relaciones genéticas entre poblaciones silvestres, cultivadas e intermedias de frijol común del occidente de México usando marcadores ISTRs (Inverse Sequence-Tagged Repeat).

### **3.3 Objetivos particulares**

Evaluar la utilidad de los ISTRs como marcadores para discriminar entre poblaciones silvestres, cultivadas e intermedias de frijol común.

Determinar la estructura genética de las poblaciones de frijol común utilizando marcadores ISTRs.

Determinar la diferenciación genética entre las poblaciones cultivadas, silvestres e intermedias de frijol común.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Material vegetal**

Se seleccionaron treinta poblaciones de frijol común de las cuales cinco son formas cultivadas, cinco silvestres y veinte intermedias, provenientes de distintos puntos del estado de Jalisco y Nayarit. El material vegetal fue colectado por el proyecto BEI - FRI - 09 auspiciado con fondos federales del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos (SINAREFI). El germoplasma se encuentra resguardado en el banco de germoplasma del Instituto de Manejo y Aprovechamiento de los Recursos Fitogenéticos (IMAREFI) del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara. En el presente trabajo, el término accesión será utilizado como sinónimo de las poblaciones. Quince plantas de cada población se sembraron en invernadero cada una en un surco de 4 m. De cada población se tomaron al azar muestras de follaje de diez individuos en la etapa de prefloración. Se obtuvo un total de trescientos individuos para el estudio.



Figura 4. Muestras de semilla de las treinta poblaciones de frijol común estudiadas. Al centro del espiral las poblaciones cultivadas (primeras diez) y al final con las poblaciones cultivadas (últimas diez), las demás correspondientes a las poblaciones intermedias.

Los materiales utilizados, difieren principalmente en el grado de manejo al que fueron o están siendo sujetas por el hombre y en los caracteres morfológicos. Se distinguen tres formas principales: cultivada, intermedia y silvestre.

Las poblaciones cultivadas son también conocidas como variedades criollas. Estas fueron generadas por selección artificial empírica a través de miles de años. Se caracterizan por su mayor precocidad y por tener semillas grandes así como por la variación amplia en el color de las mismas. Las plantas con forma intermedia son presumiblemente producto de la cruce natural entre frijoles silvestres y variedades domesticadas (Lépiz y cols. 2010). Estas producen pocas semillas por vaina pero más grandes que la forma silvestre (Delgado y cols. 1988; Zizumbo y cols. 2005) y la variación en el color de la semilla es muy alta. Estas se encontraron en sitios donde crecen las poblaciones silvestres y

cercanas a parcelas donde se cultiva o se cultivó frijol. Por último, las poblaciones silvestres no han sido sometidas a ningún manejo por parte del hombre y se colectaron en hábitats libres o con limitada perturbación humana, y presentan semillas pequeñas. La ubicación geográfica de los sitios de colecta de las poblaciones se presenta en la Figura 5.

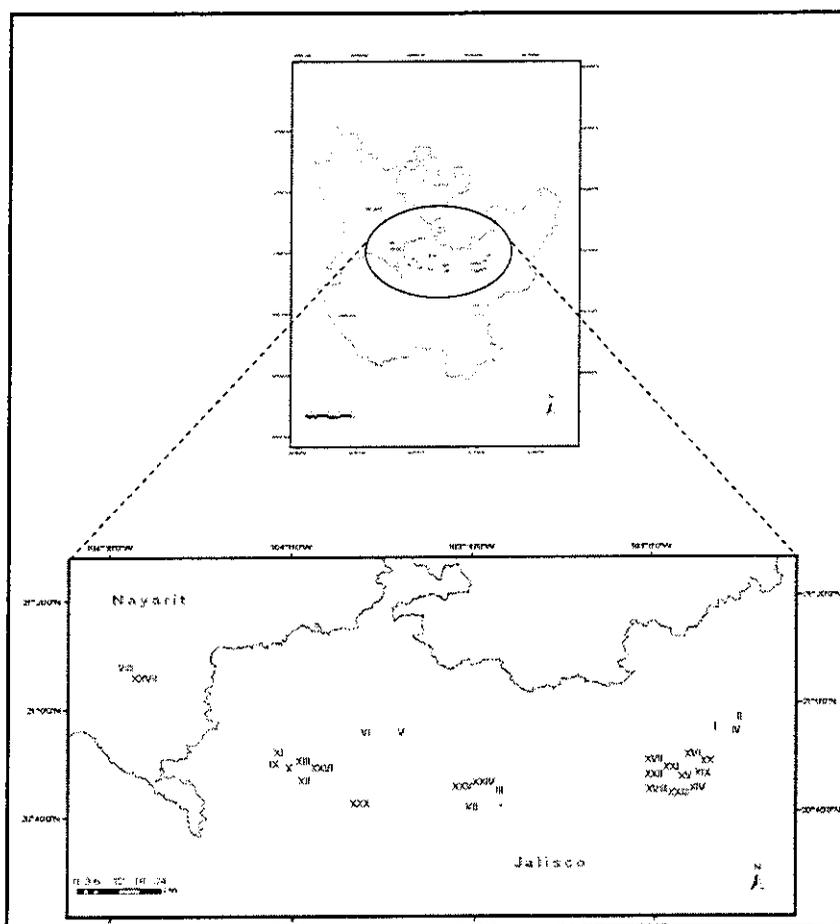


Figura 5. Representación gráfica de los sitios de colecta de las poblaciones de frijol común estudiadas, I - V: cultivadas, VI - XXV: intermedias y XXVI - XXX: silvestres.

Los rasgos del color de la semilla, información de sitio de colecta, forma y nomenclatura para cada población incluida en este estudio se presentan en el Cuadro 2. La variabilidad en el tamaño y color de la semilla de las poblaciones utilizadas se ilustra en las Figuras 4, 6 y 7.

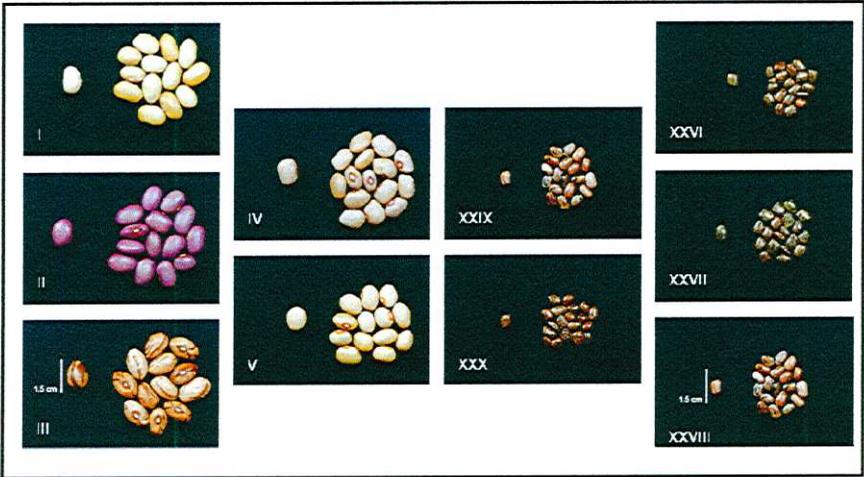


Figura 6. Semillas de las poblaciones cultivadas y silvestres de frijol común estudiadas, poblaciones cultivadas (I - V); poblaciones silvestres (XXVI - XXX).

Cuadro 2. Rasgos del color de la semilla, información de sitio de colecta, forma y nomenclatura de las poblaciones de frijol común estudiadas.

POBLACIÓN	FORMA	CLAVE	SITIO DE COLECTA	LAT	LONG	ALTITUD Msnm	COLOR SEMILLA	PESO g/100 semilla
GARBANCILLO ZARCO TP	C	I	Tepatitlán <sup>1</sup>	20°55'	102°47'	2,067	Amarillo crema	32.2
MORADO DE AGUA BURRO	C	II	Tepatitlán <sup>1</sup>	20°55'	102°47'	2,067	Morado	39.2
PEREGRINO	C	III	Zapopan <sup>1</sup>	20°44'	103°30'	1,578	Ojo de cabra	56.0
G. ZARCO SS	C	V	Tequila <sup>1</sup>	20°54'	103°43'	1,189	Rosita jaspeado	42.95
ROL-133-1	I	VI	Tequila <sup>1</sup>	20°54'	103°49'	1,122	Amarillo crema	44.4
ROL-168-1-2	I	VII	Zapopan <sup>1</sup>	20°44'	103°30'	1,578	Crema jaspeado	13.2
ROL-172-3-1	I	VIII	Jala <sup>2</sup>	21°06'	104°27'	1,165	Ojo de cabra	10.8
ROL-227-1-2	I	IX	San Pedro <sup>1</sup>	20°49'	104°04'	1,472	Crema jaspeado	15.8
ROL-227-2-1	I	X	San Pedro <sup>1</sup>	20°49'	104°04'	1,472	Bayo bola	14.8
ROL-227-2-2	I	XI	San Pedro <sup>1</sup>	20°49'	104°04'	1,472	Rosita	22.2
ROL-227-3-1	I	XII	San Pedro <sup>1</sup>	20°49'	104°04'	1,472	Negro	13.6
ROL-312-1-1	I	XIII	San Pedro <sup>1</sup>	20°49'	104°04'	1,472	Café oscuro	21.0
ROL-323	I	XIV	Acatic <sup>1</sup>	20°49'	102°59'	1,633	Café verde	16.8
ROL-323-1	I	XV	Acatic <sup>1</sup>	20°49'	102°59'	1,633	Negro	18.0
ROL-323-3	I	XVI	Acatic <sup>1</sup>	20°49'	102°59'	1,633	Bayo bola	25.4
ROL-328-1-1-2	I	XVII	Acatic <sup>1</sup>	20°49'	102°59'	1,348	Rosita oscuro	17.2
ROL-328-1-2	I	XVIII	Acatic <sup>1</sup>	20°49'	102°59'	1,348	Café jaspeado	18.0
ROL-328-1-5	I	XIX	Acatic <sup>1</sup>	20°49'	102°59'	1,348	Rosita crema	25.6
ROL-328-2-1-1	I	XX	Acatic <sup>1</sup>	20°49'	102°59'	1,348	Bayo	20.2
ROL-328-2-1-2	I	XXI	Acatic <sup>1</sup>	20°49'	102°59'	1,348	estriado	21.8
ROL-328-3-1	I	XXII	Acatic <sup>1</sup>	20°49'	102°59'	1,348	Amarillo jaspeado	18.6
ROL-330-1	I	XXIII	Acatic <sup>1</sup>	20°49'	102°59'	1,600	Bayo jaspeado	11.9
ROL-362-2-1	I	XXIV	Zapopan <sup>1</sup>	20°45'	103°31'	1,544	Negro brillante	20.6
ROL-362-2-2	I	XXV	Zapopan <sup>1</sup>	20°45'	103°31'	1,544	Bayo estriado	17.0
ROL 228	S	XXVI	San Pedro <sup>1</sup>	20°49'	104°04'	1,472	Bayo claro	15.4
ROL 241	S	XXVII	Jala <sup>2</sup>	21°06'	104°27'	1,161	bola	9.8
ROL 262	S	XXVIII	Magdalena <sup>1</sup>	20°51'	103°59'	1,474	Amarillo jaspeado	12.8
ROL 322	S	XXIX	Acatic <sup>1</sup>	20°49'	102°58'	1,633	Gris jaspeado	8.8
ROL 452	S	XXX	Teuchitlán <sup>1</sup>	20°41'	103°51'	1,273	Gris jaspeado	12.0
							Gris jaspeado	11.8

Forma = C = cultivada, I = intermedia y S = silvestre; Clave= número de población asignado. <sup>1</sup> = Jalisco <sup>2</sup> = Nayarit. Msnm: metros sobre el nivel del mar.

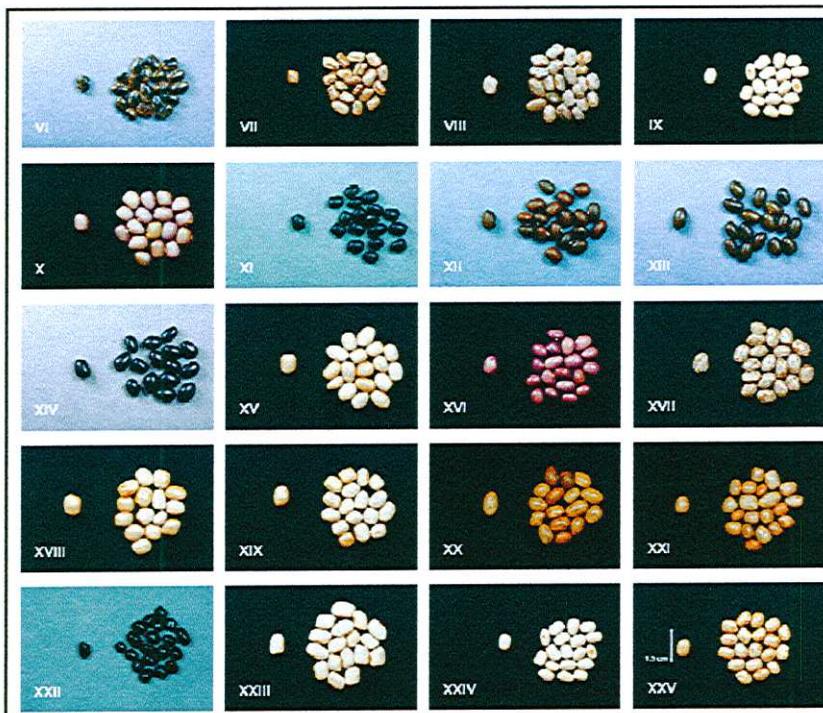


Figura 7. Semillas de las poblaciones intermedias de frijol común utilizadas (VI - XXV).

#### 4.2 Extracción de ADN genómico

Para la aplicación del marcador molecular se extrajo el ADN de los trescientos individuos usando el método reportado por Saghai-Marouf y cols. (1984). Esto se llevó a cabo en el Laboratorio de Marcadores Moleculares del IMAREFI (Instituto de Manejo y Aprovechamiento de Recursos Fitogenéticos) del Centro

Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

Una vez obtenido el ADN éste se cuantificó y evaluó por espectrofotometría. La calidad e integridad de la molécula se evaluó en geles de agarosa al 1 % de acuerdo a los protocolos estándar (Sambrook y Russell, 2001). Se realizaron diluciones de trabajo a una concentración de 100 ng/ $\mu$ L y 25 ng/ $\mu$ L para la posterior aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

#### **4.3 Amplificación**

Para la amplificación por PCR se utilizó el protocolo reportado por Osorio y cols. 2006. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ L utilizando 25 ng de ADN, amortiguador PCR 1 X [pH 7.2 Tris-HCl], 3 mM de  $MgCl_2$ , 0.3  $\mu$ M de cada iniciador, 0.25 mM de dNTPs y Taq polimerasa 1U. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un primer ciclo de desnaturalización de 95 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 3 seg; alineación a 45 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 2 min, finalizando con una extensión final de 10 min a 72 °C y una temperatura de almacenamiento a 4 °C.

Para generar los patrones de bandeo con ISTR se emplearon dos combinaciones de iniciadores: F91 / B31 y F10 / B11 (Anzinar y cols. 1998; Infante, 2000), en donde F indica el iniciador sentido y B el iniciador antisentido. Las secuencias de cada uno de los iniciadores se indican en el Cuadro 3. Posteriormente los productos de la amplificación se separaron en geles de poliacrilamida desnaturalizante al 6 % en cámara de electroforesis vertical a 200

volts durante 5 h. Se tiñeron con sales de plata para su visualización según el protocolo de Sanguinetti y cols. (1994). Se utilizó un sistema de fotodocumentación Kodak® 100 para la visualización y captura de los geles.

Cuadro 3. Secuencia de los iniciadores utilizados.

INICIADOR	SECUENCIA 5' – 3'
<b>F91</b>	ATA TGG ACT TAA GCA AGC CA
<b>B31</b>	ATT CCC ATC TGC ACC AAT
<b>F10</b>	TAA GCA AGC ATC TCG GAG
<b>B11</b>	ATC AGG AAG GTC TGT AAA GC

#### 4.4 Análisis estadísticos

Se registró la presencia/ausencia de bandas amplificadas obtenidas de los geles de poliacrilamida. Con estos datos se construyó una matriz binaria para cada gel. Estos datos se utilizaron para los análisis posteriores.

Se calculó el porcentaje de polimorfismo detectado por cada combinación de iniciadores, considerando como monomórficas las bandas presentes en más del 95% de los individuos.

Para calcular las relaciones genéticas entre las poblaciones se utilizó el coeficiente de similitud de Jaccard  $[ F = M_{xy} / (M_t - M_{xy0}) ]$  donde  $M_{xy}$  se refiere al total de número de bandas compartidas entre los individuos  $x$  y  $y$ ;  $M_t$  es el número total de bandas en el conjunto de datos; y  $M_{xy0}$  es el número total de bandas ausentes en el conjunto de datos, ya sea en  $x$  o en  $y$ . Este coeficiente

es adecuado para la estimación de similitudes genéticas para datos provenientes de marcadores dominantes (Lowe y cols. 2004). El análisis de agrupamiento se realizó utilizando el método UPGMA (Unweighted Pair Group with Arithmetic Average), incluyendo la información obtenida con las dos combinaciones de iniciadores. Ambas estimaciones se realizaron utilizando el programa estadístico NTSys versión 2.11 (Rohlf, 2002). Los resultados de agrupamiento obtenidos y los valores del remuestreo se reportan en un dendrograma (Figura 9). Los valores del remuestreo fueron obtenidos con el programa Free Tree versión 0.9.1.50 (Plavicek y cols. 1999), y visualizados con el programa Tree View.

Para confirmar la robustez de la topología del dendrograma se utilizó la técnica de remuestreo (Bootstrap) con el 95% de confianza y 5000 repeticiones con el programa Free Tree (Pavlicek y Flegr, 2001). Esta técnica consiste en obtener muestras del mismo tamaño de la original " $n$ ", se obtienen  $n$  observaciones al azar con reemplazo, de tal manera que cada observación tiene la misma probabilidad de escogerse en cualquier etapa. Algunos elementos aparecerán varias veces en una muestra, mientras que otros pueden no aparecer en ninguna. Cuando se obtiene la distribución del muestreo, es posible obtener intervalos de confianza de los estimadores (Weir, 1996, citado por Sánchez, 2006). El remuestreo ha cobrado auge en los últimos años para otorgar soporte estadístico a las topologías de los dendrogramas obtenidos a partir de marcadores dominantes y codominantes en análisis fenéticos (Cesoniene y cols. 2007; Ganesh Ram y cols. 2007; Ipek y cols. 2008; Pakkad y cols. 2008).

Por último se analizó la estructura genética de las poblaciones usando el programa STRUCTURE versión 2 (Pritchard y cols. 2000), estrategia que está basada en métodos de agrupamiento probabilísticos y ha sido tema de gran cantidad de publicaciones en años recientes, iniciando con los trabajos de Pritchard y cols. (2000). Estos autores proponen el uso de modelos Bayesianos basados en análisis de agrupamiento; uno de los aspectos más relevantes en este tipo de estrategia, es el análisis y definición de grupos y la ubicación de cada uno de los individuos a dichos grupos. Aún cuando la implementación de los métodos de cómputo ha sido muy compleja, el principio es relativamente sencillo.

Suponiendo que todos los individuos son parte de  $K$  poblaciones y representando las frecuencias fenotípicas de las poblaciones  $k$  por  $\gamma_k$ , entonces la probabilidad de que el individuo  $i$  provenga de la población  $k$  será:

$$P(i/k) = \frac{P(X_i / \gamma_k)}{\sum_k P(X_i / \gamma_k)}$$

En donde  $x_i$  se refiere a los datos correspondiente al individuo  $i$ . Si asignamos las probabilidades para  $\gamma_k$ , es posible entonces calcular las probabilidades posteriores con base en métodos Bayesianos, de que el individuo  $i$  pertenezca al grupo  $k$ . Este método permite que los individuos puedan ser producto de una mezcla entre dos o más poblaciones. Esta aproximación metodológica usa métodos de Montecarlo para estimar las frecuencias alélicas de cada una de las poblaciones ( $K$ ) y la proporción del genoma de cada individuo respecto a las diferentes poblaciones ( $q_k$ ). El programa de cómputo con mayor uso en la

literatura especializada es STRUCTURE (Pritchard y cols. 2002). Por lo general se estima el número de grupos con base en simulaciones. En el presente trabajo, se usó el programa bajo las siguientes condiciones: 8,000 iteraciones y 8000 simulaciones, usando un modelo con mezcla (admixture) que supone que puede existir hibridización entre los individuos de diferentes poblaciones. Para estimar el número óptimo de grupos se utilizó prueba estadística  $\Delta$  utilizando la sumatoria del programa STRUCTURE (Evanno y cols. 2005).

Los valores de diferenciación genética se obtuvieron en términos de frecuencias alélicas calculadas por el programa STRUCTURE. Estos valores van de 0 a 1 y a continuación se describe la interpretación de los mismos: 0 = no diferenciación,  $< 0.05$  = diferenciación pequeña,  $0.05 < y < 0.15$  = diferenciación moderada,  $0.15 < y < 0.25$  = diferenciación grande,  $> 0.25$  = diferenciación muy grande, 1 = fijación de alelos alternativos en diferentes poblaciones o subpoblaciones.

## V. RESULTADOS

En los geles obtenidos, los patrones de amplificación para cada grupo, fueron diferentes en las dos combinaciones de iniciadores. Las diferencias entre las diferentes formas de frijol fueron visualmente detectables y estos patrones diferenciales fueron perceptibles a simple vista en los geles (Figura 8).

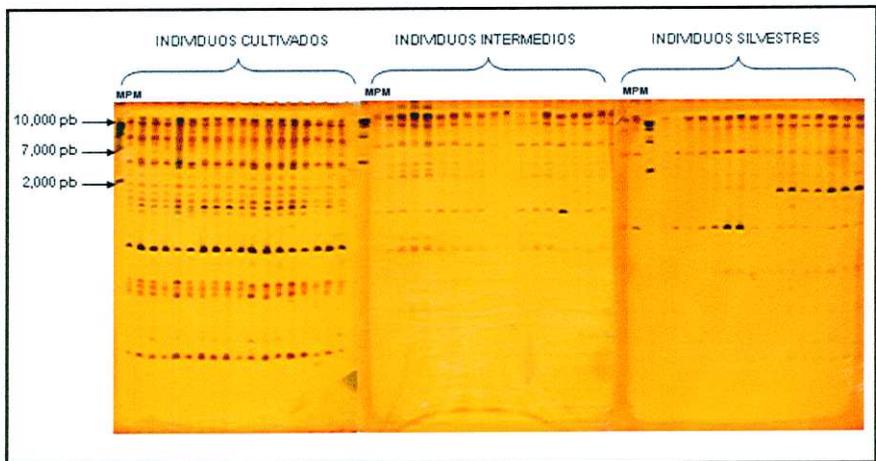


Figura 8. Patrones de amplificación con la combinación de iniciadores F91/B31 para individuos de las tres formas de frijol común bajo estudio.

Se produjeron un total de 66 bandas (loci), el porcentaje de polimorfismo detectado fue diferente para cada combinación de iniciadores y osciló entre 83 y 89 % (Cuadro 4).

Cuadro 4. Número de bandas polimórficas y porcentaje de polimorfismo detectado con dos combinaciones de iniciadores de ISTR en las poblaciones de frijol común estudiadas.

Iniciadores	Total de bandas producidas	Número de bandas polimórficas	Porcentaje de polimorfismo
F91 / F31	48	43	89.5
F10 / B11	18	15	83.3
TOTAL	66	58	87.9

El coeficiente de similitud de Jaccard mostró un valor máximo de 0.66 entre las poblaciones XVI y XVII. En el otro extremo, el valor más bajo fue de 0.17, entre las poblaciones II y XXX. Las poblaciones más parecidas genéticamente corresponden a la categoría de intermedias (XVI y XVII), mientras que las menos parecidas genéticamente, una corresponde a la categoría de cultivadas (II) y otra a la categoría de silvestre (XXX).

El análisis de agrupamiento (UPGMA) mostró una separación de las poblaciones en ocho grupos (Figura 9). La agrupación corresponde a una clara división entre las formas silvestres y cultivadas. Seis poblaciones intermedias (VII, VI, VIII, IX, X y XI) se asociaron con las formas cultivadas mientras que otras dos de la misma categoría (XXIV y XXV) con las silvestres. En contraste,



analizar los valores correspondientes a las ramificaciones se observó que la mayor consistencia (valor mayores al 50%) se encuentra entre pares de poblaciones mientras que las ramificaciones más externas tienen valores que fluctúan entre bajos y altos (20% - 100%).

Los resultados obtenidos por el programa STRUCTURE confirman la existencia de diferenciación genética y ofrecen una aproximación a la estructura genética de las poblaciones bajo estudio. En los valores probabilísticos obtenidos con STRUCTURE, el número óptimo de grupos indicado fue de  $K=9$ . Lo anterior difiere con lo encontrado por el análisis de agrupamiento (UPGMA), en el que se encontraron ocho grupos. Las diferencias observadas en el número de grupos obtenidos es producto de la metodología de análisis. La división de los materiales de frijol común con diferente forma en treinta poblaciones difiere de las agrupaciones sugeridas al analizar genéticamente dichos materiales en base a dos metodologías distintas (UPGMA e inferencia bayesiana).

La representación gráfica obtenida para los valores de  $K$  calculados ( $K=2$  a  $K=10$ ) sugiere infiltración genética para cada agrupación (Figura 10). Los valores de diferenciación genética calculados con el programa STRUCTURE se reportan en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Valores de diferenciación genética (Fst) obtenidos para los valores de K (1 - 9) sugeridos por el programa STRUCTURE.

Grupo (K)	Fst (diferenciación genética)
1	0.2449
2	0.3746
3	0.5457
4	0.6867
5	0.2296
6	0.6340
7	0.6078
8	0.4540
9	0.7218

Por lo anterior, puede observarse que la diferenciación genética entre los grupos va de moderada a muy grande, ya que los valores se encuentran en el rango de 0.2296 (grupo 5) y 0.7218 (grupo 9). Por lo tanto existe una diferenciación genética significativa. El valor más alto de diferenciación genética fue para K = 9, grupo compuesto de individuos silvestres e intermedios solamente.

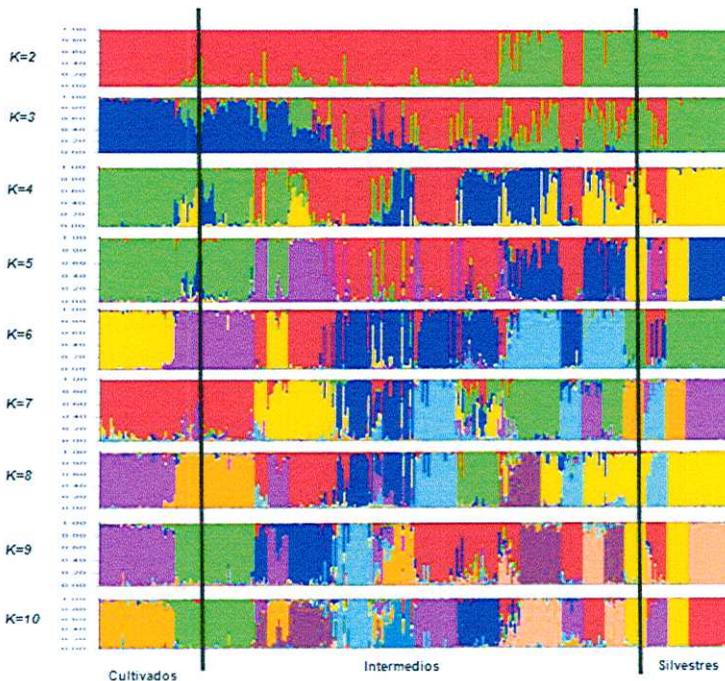


Figura 10. Representación gráfica del análisis con el programa STRUCTURE, donde se muestran nueve simulaciones ( $K = 2$  a  $K = 10$ ). En cada simulación se presentan los grupos con diferente color, bajo de ellos se indican las formas predeterminadas de las accesiones.

En el análisis para el número óptimo de grupos  $K = 9$ , algunos grupos resultaron de interés. Los grupos de interés fueron:  $K = 3$  que se conformo de intermedias solamente,  $K = 4$  que se compuso exclusivamente de silvestres y  $K = 6$ ,  $K = 7$  y  $K = 8$  en donde se ubicaron individuos intermedios.  $K = 9$  se conformó de intermedias y silvestres. Los demás grupos consistieron de una mezcla entre las diferentes formas, que se describen a continuación:  $K = 1$  se compuso de silvestres e intermedias en su mayoría,  $K = 2$  consistió de cultivadas e intermedias,  $K = 5$  con cultivadas e intermedias. En ninguna

agrupación se observaron accesiones cultivadas y silvestres juntas. Esto muestra congruencia con la agrupación obtenida por UPGMA en donde se observó ausencia de materiales silvestres con los cultivados.

## VI. DISCUSIÓN

Se observó un mayor número de bandas obtenidas con las dos combinaciones del marcador ISTR en las poblaciones cultivadas e intermedias en comparación a las silvestres, lo que pudiera sugerir el efecto a través del tiempo en la generación de variación genética por el manejo del hombre sobre *Phaseolus vulgaris*. Sería necesario estudiar la diversidad a profundidad para revelar el estado actual de los complejos cultivado-intermedio-silvestre.

Los resultados de agrupamiento y estructura genética confirman que existe hibridación entre poblaciones de frijol cultivadas y silvestres que presumiblemente origina a las poblaciones intermedias. Esta observación se puede explicar con base en la agrupación de las poblaciones intermedias con las cultivadas o con las silvestres, y con base a la representación gráfica de la estructura poblacional obtenida con STRUCTURE. La interpretación concuerda con resultados obtenidos por Papa y Gepts (2003) a partir de AFLPs en poblaciones domesticadas, silvestres e intermedias de frijol común provenientes del complejo Mesoamericano. En este caso, la ausencia de materiales domesticados en la agrupación de los materiales silvestres indica asimetría en el flujo genético entre estas dos formas. Análogamente, señalan el origen de las formas intermedias como resultado de hibridación entre las formas domesticadas y silvestres.

López y cols. (2010) compararon poblaciones de frijol cultivadas, silvestres e intermedias utilizando marcadores morfoagronómicos. Aunque muy similares,

las poblaciones de dicho estudio no coinciden al 100% con las poblaciones analizadas en este trabajo. Aún así, es posible establecer comparaciones entre ambos estudios. En primer lugar, encontraron a las poblaciones intermedias más cercanas a las silvestres. Esto difiere con los resultados encontrados en el presente estudio; pues algunas poblaciones intermedias se agruparon con las silvestres y las cultivadas o bien como grupo independiente. Las diferencias pueden explicarse con base al tipo de datos (morfológico vs. molecular) analizados y a las diferencias entre los materiales. No obstante se puede afirmar que los marcadores ISTRs ofrecen información valiosa, pues al igual que Lépiz y cols. (2010) sugieren infiltración genética entre las formas de frijol común. Sin embargo, para generar un marco más completo sería necesario combinar información morfoagronómica y datos moleculares en los mismos materiales para observar su correlación.

El acomodo de las poblaciones cultivadas separadas de las silvestres las señalan como grupos independientes que han dado origen presumiblemente a los grupos intermedios. El grupo intermedio contiene accesiones que cuentan con secuencias retrotransponibles que coinciden o bien con las cultivadas o con las silvestres y que las agrupan con dichos grupos o como grupo independiente, lo que lo hace representar un grupo diverso en cuanto a las relaciones genéticas detectadas por el marcador ISTR. Esto concuerda con la diversidad morfológica detectada a simple vista presente en dicho grupo (Figura 6).

El número óptimo de grupos señalado con el programa STRUCTURE ( $K= 9$ ) difiere con lo encontrado por el análisis de agrupamiento (UPGMA) en el que se

encontraron ocho grupos, lo cual se debe a la diferencia en la metodología de análisis. Este número de grupos corresponde a las asociaciones realizadas con base a los patrones de bandeo obtenidos por el marcador particular del estudio y ofrece una imagen distinta a la suposición de la presencia de treinta poblaciones. La anterior división está basada en datos morfológicos y geográficos de tres grupos con diferente forma (cultivadas, silvestres e intermedias). Este número ( $K = 9$ ) indica heterogeneidad genética presente en las poblaciones de frijol común provenientes del Occidente de México.

La comprensión de la importancia relativa de los procesos que causan la diferenciación genética se ha señalado como una tarea difícil (Cabe y Alsted, 1994). Aún así, en el presente caso se puede afirmar que ésta ha sido influenciada principalmente por los procesos de selección artificial y flujo genético entre las poblaciones de frijol común, éste último podría representar una herramienta o amenaza para la diversidad del recurso. Los altos valores de diferenciación genética sugieren autogamia considerable, lo que concuerda con la biología de la especie. La limitación geográfica de los materiales bajo estudio disminuyó las posibilidades de realizar un análisis con mayor resolución en los que se pudiera definir a los grupos ( $K$ ) en base a la ubicación geográfica de los individuos asignados. Sin embargo el análisis ofreció información valiosa respecto a la estructura poblacional en base a la forma de las accesiones.

La conservación de las poblaciones bajo estudio es importante para disponer de la variabilidad genética existente, sin embargo para evaluar las prioridades de conservación de los recursos fitogenéticos de *Phaseolus vulgaris* del occidente

de México, sería necesario incluir otro tipo de marcadores para estimar con mayor precisión datos sobre situaciones de diversidad genética, flujo génico y dinámica evolutiva.

## VII. CONCLUSIONES

El porcentaje de bandas polimórficas que se obtuvieron con el marcador ISTR, indica que puede ser un marcador confiable para diferenciar genéticamente a las poblaciones con diferente forma de frijol común.

El grupo considerado como intermedio representa un grupo diverso en cuanto a las relaciones genéticas detectadas por el marcador ISTR, pues existen accesiones molecularmente cercanas tanto a las poblaciones silvestres como a las poblaciones cultivadas; sin embargo un mayor número de poblaciones se agruparon independientemente, sugiriendo que forman un grupo aparte y que deben considerarse de importancia para su estudio y conservación.

La manera en que se agruparon las poblaciones en el dendrograma, nos indicó que este marcador detecta las variaciones en el genoma de las plantas estudiadas, provocadas por elementos retrotransponibles que presumiblemente reflejan hibridación y flujo genético entre las formas cultivadas y silvestres como origen de las formas intermedias.

La infiltración genética quedó evidenciada tanto en el agrupamiento UPGMA como por los datos y representación gráfica obtenida con STRUCTURE.

Los altos valores de diferenciación genética ( $F_{st}$ ) obtenidos a partir de la estructuración genética con el programa STRUCTURE sugieren que las poblaciones con diferente forma de frijol común se encuentran altamente

diferenciadas, particularmente aquellas con forma silvestre e intermedia, producto de la autogamia de la especie.

El número de grupos sugerido como óptimo por el programa STRUCTURE (nueve) representa la alta variación en las poblaciones, a partir de esta información genética se puede afirmar que la clasificación de treinta poblaciones podría ser sobrestimada.

La representación gráfica y los valores obtenidos con el programa STRUCTURE sugieren que en todas las poblaciones de frijol con diferente forma existe el flujo genético y en ellas se encuentran secuencias retrotransponibles que comparten, por lo que dichas poblaciones representan un complejo heterogéneo en el que la selección artificial y la hibridación han jugado un papel importante.

La presencia *in-situ* de los complejos cultivado-silvestre-intermedio en la región del occidente de México parece ser un factor importante para la conservación de la diversidad genética de frijol común, sin embargo las relaciones deberían ser estudiadas con mayor profundidad en aspectos de flujo genético, diversidad genética y dinámica evolutiva.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Acosta-Gallegos, J.A., D. Kelly y P. Gepts. 2007. Prebreeding in common bean and use of genetic diversity from wild germplasm. *Crop Sci.* 47 (3): 44 - 59.
- Allem, A.C. 2000. The terms genetic resource, biological resource, and biodiversity examined. *The Environmentalist.* 20: 335 - 341.
- Anzinar, I., M. Herrera, W. Rohde, A. Santos, J.L. Dowe, P. Goikoetxea y E. Ritter. 1998. Studies on the suitability of RAPD and ISTR for identification of palm species (*Arecaceae*). *Taxon.* 47: 635 - 645.
- Asfaw, A., M.W. Blair y C. Almekinders. 2009. Genetic diversity and population structure of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from the East African highlands. *Theor. Appl. Genet.* 120: 1 - 12.
- Ayad, W.G.W. 1980. A glossary of plant genetic resources terms. IBPGR. FAO.
- Beebe, S., O. Toro, A. González, M. Chacón y D. Debouck. 1997. Wild-weed-crop complexes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) in the Andes of Peru and Colombia, and their implications for conservation and breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 44: 73 - 91.
- Bennetzen, J.L. 2000. Transposable element contribution to plant gene and genome evolution. *Plant. Mol. Biol.* 42: 251 - 269.
- Cabe, P.R. y D.N. Alstad. 1994. Interpreting population differentiation in terms of drift and selection. *Evolutionary Ecology.* 8 (5): 489 - 492.

- Cesoniene, L., R. Daubaras, y B. Gelvonauskis. 2007. Evaluation of genetic diversity and genetic relationships among female Lithuanian accessions of Kolomikta kiwi. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 15: 95 - 102.
- Chacón, M.I., B. Pickersgill, y D.G. Debouck. 2005. Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. *Theor. Appl. Genec.* 110: 432 - 444.
- Chiorato, A. F., S. A. Morais, L. dos Santos, R. Ramos, M. Barbosa y C. Colombo. 2006. Identification of common bean (*Phaseolus vulgaris*) duplicates using agromorphological and molecular data. *Genetics and Molecular Biology* 29 (1): 105 - 111.
- Debouck, D., O. Toro, M. Paredes, W.C. Jonson y P. Gepts. 1993. Genetic diversity and ecological distribution on *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) in Northwestern South America. *Econ. Bot.* 47: 408 - 423.
- Espinoza-Alonso, G., A. Lygin, J.M. Widholm, M.E. Valverde, y O. Paredes-López. 2006. Polyphenols in Wild and Weedy Mexican Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food. Chem.* 54 (12): 4436 - 4444.
- Evanno, G., S. Regnaut y J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14: 2611 - 2620.

- Finnegan, D.J. 1989. Eukaryotik transposable elements and genome evolution. Trends. Genet. 5: 103 - 1077.
- FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura). 2001. El frijol en México: competitividad y oportunidades de desarrollo. <http://www.fira.gob.mx/SAS/Docs/BFIRA/Frijol%20en%20Mexico.pdf>.
- Fraleigh, B. 2006. Global overview of crop genetic resources. En: The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources. Ruane, J. y A. Sonnino (eds). FAO. p: 24.
- Freyre, R., P. Skroch, V. Geffroy, A.F. Adam-Blondon, A. Shirmohamadali, W. Johnson, V. Llaca, R. Nodari, P. Pereira, S.M. Tsai, J. Tohme, M. Dron, J. Nienhuis, C.E. Vallejos y P. Gepts. 1998. Towards an integrated linkage map of common bean. Development of a core map and alignment of RFLP maps. Theor. Appl. Genet. 97: 847-856.
- Ganesh Ram, S., V. Thiruvengadam, y K.K. Vinod. 2007. Genetic diversity among cultivars, landraces and wild relatives of rice as revealed by microsatellite markers. J. Appl. Genet. 48 (4): 337 - 345.
- Garduño-González, J., E.J. Morales-Rosales, S. Guadarrama-Valentín y J.A. Escalante-Estrada. 2009. Biomasa y rendimiento de frijol con potencial ejotero en unicultivo y asociado con girasol. Revista Chapingo Serie Horticultura. 15 (1): 33 - 39.
- Gepts, P., T. C. Osborn, K. Rashka y F. A. Bliss. 1986. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus*

*vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. *Econ. Bot.* 40: 451 - 468.

Gepts, P. y D. Debouck. 1991. Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). En: *Common Beans. Research for Crop Improvement.* van Schoonhoven A. y Voyses O. (eds). C.A.B. International. p: 7 - 53.

Gepts, P., F. Aragão, E. de Barros, Blair W., R. Brondani, W. Broughton, I. Galasso, G. Hernández, J. Kami, P. Lariguet, P. McLean, M. Melotto, P. Miklas, P. Pauls, A. Pedrosa-Harand, T. Porch, F. Sánchez, F. Sparvoli y K. Yu. 2008. Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. En: *Genomics of tropical plants.* Moore P.H. y R. Ming (eds). Springer. p: 113 - 143.

Graur, D., y W.H. Li. 2000. *Fundamentals of Molecular Evolution.* Sinauer Associates. USA.

Guzmán-Maldonado, S.H., J. Acosta-Gallegos, y O. Paredes-López. 2000. Protein and mineral content of a novel collection of wild and weedy common bean (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Journal of Science of Food and Agriculture.* 80 (13): 1874 - 1881.

Hawkes, J.G., N. Maxted y B.V. Ford-Lloyd. 2000. *The ex-situ conservation of plant genetic resources.* Boston Kluwer Academic Publishers. p: 7 - 8.

Hodgkin, T. y R. Rao. 2002. *People, Plants and DNA: Perspectives on the Scientific and Technical Aspects of Conserving and Using Plant Genetic*

- Resources. En: Managing Plant Genetic Diversity. Engels, J.M., V.R. Rao, A.H.D. Brown y M.T. Jackson (eds). CABI Publishing IPGRI. p: 469.
- Infante, D. 2000. Comunicación personal. Fundación Instituto de Estudios Avanzados, Venezuela.
- Ipek, M., A. Ipek y P.W. Simon. 2008. Molecular characterization of Kastamonu garlic: an economically important garlic clone in Turkey. *Scientia Horticulturae*. 115: 203 - 208.
- Kalendar, R., A.J. Flavell, THN. Ellis, T. Sjakste, C. Moisy y AH. Schulman. 2010. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. *Heredity Online Journal*. 1 - 11.
- Kazazian, H.H. 2004. Mobile elements drivers of genome evolution. *Science*. 303: 1626 -1632.
- Kelly, J.D., P. Gepts, P.N. Miklas, y D.P. Coyne. 2003. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field. Crops. Res.* 82: 135–154.
- Kwak, M. y P. Gepts. 2009. Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae): *Theor. Appl. Genet.* 118: 979 - 992.

López Ildelfonso, R. y E. Rodríguez G. 2006. Los Recursos Fitogenéticos de México. En: Molina M., J y L. Córdova T. (eds.). Recursos Fitogenéticos en México para la Alimentación y la Agricultura. P. 1-17.

López, R., J. López, J. Sánchez, F. Santacruz-Ruvalcaba, R. Nuño y E. Rodríguez. 2010. Características morfológicas de formas cultivadas, silvestres e intermedias de frijol común de hábito trepador. Rev. Fitotec. Mex. 33 (1): 21 - 28.

López Ildelfonso, R. y R. Ramírez Deigadillo. 2010. Los parientes silvestres del frijol en el Occidente de México. Universidad de Guadalajara, Jalisco, México. 64 p.

Lightbourn, G. y R. Villeux. 2003. Retrotransposon based markers to characterize somatic hybrids and assess variation induced by protoplast fusion of monoploid potato. Acta Horticulturae ISHS 619: 235 - 242.

Lodish, H., A. Berk, S. Lawrence Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore y J. Darnell. 2000. Mobile DNA. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21495/>.

López Soto, J. L., J. A. Ruiz C., J. J. Sánchez G. y R. López I. 2005. Adaptación climática de especies de frijol silvestre (*Phaseolus* spp.) en la República Mexicana. Revista Fitotecnia Mexicana. Vol. 28 (3): 221-230.

Lowe, A., S. Harris y P. Ashton. 2004. Ecological genetics, design, analysis, and application. Blackwell. UK.

- Martín-Martínez, I. 2005. Conservación de recursos fitogenéticos.  
[http://www.esporus.org/recursos/articulos/agrobiodiversitat/conservacion\\_recurso\\_fitogenetico\\_isaura\\_martin.pdf](http://www.esporus.org/recursos/articulos/agrobiodiversitat/conservacion_recurso_fitogenetico_isaura_martin.pdf).
- Maxted, N., B.V. Ford-Lloyd, y J.G. Hawkes. 1997. Plant Genetic Conservation. The *In-Situ* Approach. Chapman & Hall Publishers. p: 19 - 20.
- McLean, P., J. Kami y P. Gepts. 2004. Genomics and genetic diversity in common bean. En: Legume crop genetics. Wilson, F., H. Stalker y E. Brummer (eds). AOCS Press. p: 61 - 82.
- Mondini, L., A. Noorani y M.A. Pagnotta. 2009. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*. 1: 19 - 35.
- Mosquera, R.V. 2005. Marcadores moleculares y la extracción de ADN. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* Vol. 32 (3).
- Osorio, Z., M. A., D. Infante y S. Molina. 2006. Variación genética asexual en *Agave cocui* Trelease mediante el uso de marcadores moleculares. *Bol. Nakari* 17 (1): 1 - 7 edición digital.
- Pakkad, G., S. Ueno, y H. Yoshimaru. 2008. Genetic diversity and differentiation of *Quercus semiserrata* Robx. in northern Thailand revealed by nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Forest Ecology and Management*. 225: 1067 - 1077.

Papa, R. y P. Gepts. 2003. Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. *Theor. Appl. Genet.* 106: 239 - 250.

Pavlicek, A. y J. Flegr (2001), *Free Tree*,  
<http://web.natur.cuni.cz/~flegr/freetree.php>.

Payró de la Cruz, E., P. Gepts, P. Colunga y D. Zizumbo-Villareal. 2005. Spatial distribution of genetic diversity in wild populations of *Phaseolus vulgaris* L. from Guanajuato and Michoacán, México. *Genet. Res. Crop. Evol.* 52: 589 - 599.

Pearce, S.R., D. Harrison, D. Li, J.S. Heslop-Harrison, A. Kumar, y A.J. Flavell. 1996. The Ty1-copia group retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localization. *Mol. & Gen. Genet.* 250: 305 - 315.

Pritchard, J. K., M. Stehens, y P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945 - 959.

Qualset, C.O., P.E. Mcguire y M.L. Wargurton. 1995. Agrobiodiversity: key to agricultural productivity. *Calif. Agric.* 49 (6): 45 - 49.

Rohde, W. 1996. Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR-based technique for genome analysis in the plant and animal Kingdom. *J. Genet & Breed.* 50: 249 - 261.

Rohlf, J. 2002. Introduction to the exploration of multivariate biological data. Quarterly Review of Biology. 77: 50 - 51.

Rosales-Sema, R. 2009. Diversidad genética del frijol. CONABIO. Biodiversitas 89: 7 - 11.

Rubenstein, K.D., P. Heisey, R. Shoemaker, J. Sullivan y G. Frisvold. 2005. Crop genetic resources: an economical appraisal. United States Department of Agriculture. <http://www.ers.usda.gov/publications/eib2/eib2.pdf>.

Sambrook, J. y D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. 3 vol. 3ra ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. p: 999.

Sánchez G., J.J. 2006. Apuntes de la clase: Genética de la Conservación de Recursos Fitogenéticos. Universidad de Guadalajara. p: 9.

Sanguinetti, C.J., E. Días Neto y A.J. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. Biotechniques. 17 (5): 914-921.

Schulman, A.H. 2007. Molecular markers to assess genetic diversity. Euphytica. 158: 313 - 321.

Semagn, K., A. Bjornstad y M.N. Ndjiondjop. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. African Journal of Biotechnology 5 (25): 2540 - 2568.

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2010. Descripción frijol.

[http://w4.siap.gob.mx/sispro/IndModelos/SP\\_AG/Frijol/Descripcion.pdf](http://w4.siap.gob.mx/sispro/IndModelos/SP_AG/Frijol/Descripcion.pdf).

Shellie, K. y F.A. Bliss. 1991. Genetic Improvement of food quality factors. En: Common Beans. Research for crop improvement. A. van Schoonhoven and O. Voysest (eds). CIAT, CAB. 649 - 677.

Solís-Ramos, L. y A. Andrade-Torres. 2005. ¿Qué son los marcadores moleculares? La Ciencia y el Hombre. Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana. <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol18num1/articulos/moleculares/index.htm>.

Sosa, P., F. Batista, M.A. González-Pérez, y N. Bouza. 2002. La conservación genética de las especies vegetales amenazadas. En: Biología de la Conservación de plantas amenazadas. Técnicas de diagnóstico del estado de conservación. Bañares, A. (ed). Organismo Autónomo de Parques Nacionales. Ministerio de Medio Ambiente. España.

Tatieni, V., R.G. Cantrell y D.D. Davis. 1996. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPD. Crop Science 36: 186 - 192.

Wagner, G.P. 1995. Adaptation and the Modular Designs of Organisms. <http://www.cbc.yale.edu/old/cce/papers/ALife/node2.html#SECTION00020000000000000000>.

- Williams, D. 2010. Valorar para conservar los recursos fitogenéticos. Conferencia. Simposio Internacional sobre la Conservación de los Recursos Fitogenéticos. Universidad de Guadalajara.
- Yu, K., S.J. Park, V. Poysa, y P. Gepts. 2000. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Hered. 91: 429-434.
- Zizumbo-Villareal, D. 1985. Estrategias agrícolas tradicionales para el aprovechamiento del agua de lluvia durante el temporal: El caso de Yuriria Guanajuato, México. MS. Tesis. Colegio de Postgraduados, Chapingo.
- Zizumbo-Villareal, D., P. Colunga, E. Payró, P. Delgado-Valerio y P. Gepts. 2005. Population structure and evolutions dynamics of wild - weedy domesticated complexes of common bean in a Mesoamerican region. Crop. Sci. 45: 1073 - 1083.