



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DIVERSIDAD GENÉTICA DEL GERMOPLASMA MEJORADO
DEL FRIJOL COMÚN EN MÉXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

RAQUEL PAULINA DURÁN DURÁN

DIRECTOR: M.C. RIGOBERTO ROSALES SERNA

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO
2002





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



U.N.A.M. CAMPUS

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Juan y Francis

A quienes con su ejemplo, confianza, amor y constante dedicación; me han apoyado en cada paso de mi vida, por esto y mucho más...

GRACIAS

A MIS HERMANOS:

Maribel, Juan David y Paco

Por su apoyo, y estímulo de superación profesional y personal.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de ser Universitario y de prepararme profesionalmente.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por abrirme sus puertas y ofrecerme lo mejor de ella.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), por las atenciones prestadas.

Al M. C. Rigoberto Rosales Serna, por su dirección, apoyo y orientación de esta tesis. Así como la confianza que tuvo hacia mi para lograr una etapa más de mi formación profesional.

A los Profesores: M.C. Elías Piedra Ibarra, M.C. Alberto Arriaga Frias, M.C. Ramón V. Moreno Torres y Biol.. Manuel Mandujano Piña, por sus recomendaciones que enriquecieron este trabajo.

A mis Compañeros y amigos: Lourdes, Victor, Emiliano, Olivia, Yolanda, Verónica, Salvador, Ernesto, Gerardo y Ricardo, por sus consejos y haberme brindado su amistad.

INDICE

IZT.

Página

INDICE DE CUADROS	iv
INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DEL APÉNDICE	v
INDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE	v
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVOS	4
1.1.1. Objetivo General	4
1.1.2. Objetivos Específicos	5
1.1.3. Hipótesis	5
II. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1. Origen y Distribución del Frijol Común	6
2.2. Taxonomía del Frijol	6
2.3. Importancia del Frijol	7
2.3.1. Económica	7
2.3.2. Importancia alimenticia y social	8
2.4. Mejoramiento Genético en México	9
2.4.1. Métodos de mejoramiento	10
2.4.1.1. Método de introducción	10
2.4.1.2. Selección	10
2.4.1.2.1. Selección en variedades criollas	11
2.4.1.3. Cruzamiento y selección	12
2.5. Variedades Mejoradas de Frijol en México	14
2.6. Clasificación de Germoplasma de Frijol	14
2.6.1. Características morfológicas	15
2.6.2. Características del grano	16
2.6.3. Otras Formas de Clasificación	17
2.6.3.1. Caracterización con base en marcadores genéticos moleculares	17

2.6.3.1.1. Inter-secuencias simples repetidas (ISSRs)	18
2.7. Métodos de análisis y presentación de resultados	20
III. MATERIALES Y METODOS	21
3.1. Fase de Campo	21
3.1.1. Localización del área de trabajo	21
3.1.2. Germoplasma utilizado	21
3.1.3. Siembra	22
3.1.4. Manejo agronómico	23
3.1.5. Caracterización con base en atributos morfo-agronómicos	23
3.1.5.1. Variables cuantificadas	23
3.1.5.1.1. Fenológicas	23
3.1.5.1.2. Reacción a enfermedades	23
3.1.5.1.3. Variables morfo-agronómicas	23
3.2. Fase de Laboratorio	25
3.2.1. Caracterización con base en marcadores genéticos moleculares	25
3.2.1.1. Colecta del material vegetal	25
3.2.1.2. Liofilizado y molienda	26
3.2.1.3. Extracción y aislamiento del Ácido Desoxiribonucleico (ADN)	26
3.2.1.4. Cuantificación de la concentración y pureza del ADN	26
3.2.1.5. Procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	27
3.2.1.6. Programa de amplificación	27
3.3. Análisis Estadístico	29
3.3.1. Datos de variables morfo-agronómicas	29
3.3.2. Datos de los marcadores genéticos moleculares	29
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30

4.1. Caracterización Morfo-agronómica	30
4.2. Caracterización Con Marcadores Genéticos Moleculares	44
V. CONCLUSIONES	49
VI. LITERATURA CITADA	50
VII. APÉNDICE	56

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de variedades de frijol para su comercialización en México.	17
Cuadro 2. Variedades de frijol liberadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y otras instituciones, para diferentes regiones del país.	22
Cuadro 3. Cantidad y volumen de cada componente de la mezcla para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). INIFAP-CEVAMEX. 2000-2001.	27
Cuadro 4. Iniciadores o primers utilizados en la determinación de la diversidad genética del germoplasma mejorado de frijol en México. INIFAP-CEVAMEX. 2000-2001.	28
Cuadro 5. Nivel de polimorfismo obtenido con cinco iniciadores ISSRs, en variedades mejoradas de frijol. INIFAP-CEVAMEX. 2000-2001.	44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clases comerciales de grano y número de variedades mejoradas obtenidas para cada una, por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). INIFAP-CEVAMEX. 1999-2000.	30
Figura 2. Componentes principales 1 y 2 para 14 variables evaluadas en 120 variedades mejoradas de frijol. Santa Lucia de Prías, Estado de México. INIFAP-CEVAMEX. 1999-2000.	32
Figura 3. Componentes principales 1 y 2 correspondientes a 14 variables evaluadas en 120 variedades de frijol, de diferente clase comercial de grano. Santa Lucia de Prías, Estado de México. INIFAP-CEVAMEX. 1999-2000.	35

Figura 4. Mínimo, máximo y promedio para el número de días a floración y altura de planta evaluados en 120 variedades de frijol agrupadas por clase comercial. Santa Lucia de Prías, Estado de México. INIFAP-CEVAMEX. 1999-2000.	39
Figura 5. Mínimo, máximo y promedio para el peso de 100 semillas y ancho de la vaina, evaluados en 120 variedades de frijol agrupadas por clase comercial de grano. Santa Lucia de Prías, Estado de México. INIFAP-CEVAMEX. 1999-2000.	40
Figura 6. Coeficiente de similitud, para variedades mejoradas de frijol, observado en el análisis de conglomerados por el método UPGMA obtenido con base en 59 variables evaluadas durante dos años en Santa Lucia de Prías, Edo. de México. INIFAP-CEVAMEX. 1999-2000.	43
Figura 7. Coeficiente de similitud, para variedades mejoradas de frijol, observado en el análisis de conglomerados por el método UPGMA obtenido con base en ISSRs. INIFAP-CEVAMEX. 2000-2001.	45

INDICE DEL APÉNDICE

7.1A. Protocolo de Extracción y Aislamiento del Ácido Desoxirribonucleico (ADN)	56
7.2A. Instructivo Para la Preparación de las Soluciones y Reactivos Utilizados en el Proceso de Extracción del ADN	57
7.3A. Protocolo de la Electroforesis	57
7.4A. Lista de Abreviaturas	61
7.5A. Análisis electroforético de los productos amplificados de ADN obtenidos con tres diferentes primers para ISSRs	62

INDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

Cuadro 1A. Solución amortiguadora con CTAB para extracción.	57
Cuadro 2A. Algunas de las características evaluadas en variedades mejoradas de frijol liberadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y otras instituciones. INIFAP-CEVAMEX. 1999-2000.	59

RESUMEN

El conocimiento, conservación, utilización y protección de la variabilidad genética existente en un cultivo permite incrementar la eficiencia en su producción, el mejoramiento genético y su utilización sustentable. El objetivo de esta investigación fue evaluar la diversidad genética presente en el germoplasma mejorado de frijol liberado en México, con base en características morfo-agronómicas aceptadas internacionalmente y con el uso de marcadores genéticos moleculares.

Se sembraron 120 variedades mejoradas de frijol en Santa Lucia de Prías, Estado de México, en 1999 y el 2000. La parcela experimental consistió de un surco de 6 m de longitud y 70 cm de separación, con dos repeticiones por variedad. La siembra se realizó después del establecimiento de la temporada de lluvias el 6 de julio en 1999 y 23 de mayo en el 2000. Se evaluaron diferentes características morfo-agronómicas durante la estación de crecimiento. Para la caracterización con ISSR's se utilizaron siete iniciadores de los que se seleccionaron cinco que mostraron 68 bandas, en su mayoría polimórficas (82%). Los datos para 72 variables morfo-agronómicas evaluadas en campo se usaron para el análisis de componentes principales (Systat ®). Además, 59 de estas características y los resultados obtenidos por ISSR's se utilizaron en un análisis de agrupamiento (NTSYS ®) por el método de UPGMA.

La mayoría de las variedades mejoradas pertenecen a las clases comerciales negro (opaco y brillante), bayo y pinto. Esto en parte debido a que estas variedades son las más populares para su siembra y consumo en diferentes regiones de México. El análisis de componentes principales (ACP) mostró que 14 características explicaron el 60 % del total de la variación fenotípica observada. El ACP para las 120 variedades, con base en estas características, mostró tres grupos para las variedades de frijol común y uno para *P. coccineus*. El primer grupo para frijol común incluyó las variedades de tipo negro, con subdivisiones para variedades del tipo opaco pequeño y brillante mediano. Otro grupo incluyó las diferentes clases comerciales sembradas en el Altiplano y el tercer grupo incluyó las variedades de hábito de crecimiento determinado tipo I. Se observó algunos casos de variedades recombinantes con características intermedias entre grupos y razas.

De la misma manera un dendograma construido con los datos de 57 características fenotípicas mostró tres grupos principales: el primero incluyó las variedades de tipo negro, el segundo los colores sólidos de tipo brillante y el tercer grupo incluyó variedades con grano mediano con más de un color de la testa. Se observaron subdivisiones en cada grupo, el cual fue menos notoria en el grupo de variedades de tipo negro opaco, azufrado y canario, debido al uso de padres genéticamente similares en forma recurrente para mantener las características del grano y la adaptación específica a las regiones de siembra. El subgrupo de las variedades de tipo negro brillante mostró mayor variabilidad, con respecto a los negros opacos, debido probablemente a la utilización de padres de diversos orígenes en su desarrollo.

El análisis de los resultados obtenidos con los marcadores genéticos moleculares fueron similares a los registrados con las características morfológicas; aunque, se observó mayor precisión en la definición de la similitud o divergencia genética entre variedades, lo que fue corroborado con la genealogía. Se considera que la diversidad en las preferencias de consumo entre la población ha permitido conservar la diversidad genética observada en el frijol como especie. Es necesario la diversificación de los progenitores utilizados (razas y acervos genéticos) en los cruzamientos para generar nuevas variedades mejoradas.

Se observó mayor variabilidad genética entre las variedades mejoradas del Altiplano de México por la mayor diversidad entre los progenitores para lograr la adaptación entre climas, niveles de incidencia de enfermedades y el gusto de los consumidores. Las restricciones impuestas por los requerimientos del mercado, en lo que respecta a tamaño, color y forma del grano, han reducido la posibilidad de ampliar la base genética en la mayoría de las clases comerciales de frijol. El avance genético más considerable en las diferentes clases comerciales ha sido observado en la resistencia a las enfermedades, la reducción en el número de días a floración y madurez, lo que ha favorecido el incremento y estabilización del rendimiento. En México, la introducción de germoplasma de centros internacionales de mejoramiento genético han permitido ampliar la base genética del frijol como especie.

I. INTRODUCCIÓN

Desde su domesticación el frijol representó parte importante de la alimentación diaria de los mexicanos. Esta leguminosa en combinación con el maíz, aporta prácticamente el total de las proteínas que consumen los estratos sociales de más bajos ingresos (INEGI, 1988; Cárdenas, 2000). En México las especies del género *Phaseolus* de mayor importancia económica son: *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común), *Phaseolus coccineus* L. (frijol ayocote), *Phaseolus lunatus* L. (frijol lima) y *Phaseolus acutifolius* Asa Gray (frijol tepari). De estas especies, la más difundida para su siembra y consumo es el frijol común (Cárdenas, 2000). En la actualidad la población mexicana consume en promedio 15 kg de frijol por persona, al año, lo que genera un requerimiento anual cercano a un millón 500 mil toneladas. Las clases comerciales de frijol de mayor demanda en México son los tipos negro (opaco y brillante), flor de mayo, flor de junio, peruano, azufrado, pinto y bayo (Castellanos *et al.*, 1997).

Para satisfacer la demanda, en México durante el período comprendido entre 1980 a 1997, se sembraron con frijol un promedio de 2.2 millones de hectáreas (SAGAR, 1997). El frijol es sembrado prácticamente en todos los estados del país, por lo que es posible observar diferentes épocas y sistemas de producción. Los sistemas de producción están definidos principalmente con base en el ciclo de siembra (primavera-verano y otoño-invierno), régimen de humedad (temporal, riego y humedad residual) y nivel socioeconómico (agricultura de subsistencia y empresarial). En México, los principales problemas de producción del frijol son las enfermedades, las plagas, la sequía, las variaciones de temperatura y los suelos pobres en nutrientes y de baja profundidad. Los factores antes mencionados, interactúan entre sí y pueden causar la pérdida total del rendimiento. Con base en los factores antes mencionados, en nuestro país es posible distinguir cuatro regiones productoras de frijol que son: el Altiplano Semiárido (región norte-centro), Región Templada Sub-húmeda (centro del país), Trópico Seco (noreste y noroeste) y Trópico Húmedo (sur y sureste).

Se considera que el mejoramiento genético puede ser utilizado para dar solución a la problemática registrada en las diferentes regiones productoras de frijol. El mejoramiento genético es un proceso sistemático que implica la utilización de la variabilidad genética existente en una especie en particular, con el fin de obtener nuevas combinaciones de los

caracteres de interés, la selección de las mejores combinaciones (familias y líneas) y la liberación de nuevas variedades para siembras comerciales de frijol. La selección de padres y la búsqueda de combinaciones sobresalientes es uno de los pasos esenciales relacionados con el éxito o fracaso de un programa de mejoramiento genético.

En México, los trabajos de mejoramiento genético del frijol se iniciaron en forma continua y sistemática, a partir de 1943 (Cárdenas, 2000; Voysest, 2000). En las etapas iniciales se realizaron colectas de variedades nativas en las diferentes áreas productoras de frijol en nuestro país. Posteriormente, se inicio la recombinación mediante el cruzamiento entre los materiales colectados y otros introducidos del extranjero. El mejoramiento genético se ha realizado con el objetivo de incrementar el rendimiento y lograr la estabilización de éste, combinando en las variedades mejoradas la mayor cantidad de características agronómicas favorables, como la resistencia a las enfermedades, alto rendimiento, precocidad, tolerancia a la sequía, adaptación a suelos con baja fertilidad, etc. (Acosta *et al.*, 2000).

El programa de frijol del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ha desarrollado y liberado 120 variedades mejoradas de frijol para las diferentes regiones productoras (Rosales *et al.*, 2001). Además, otras instituciones de investigación y enseñanza han liberado variedades, algunas derivadas de germoplasma generado por INIFAP. Lo anterior, ha permitido dar solución total y/o parcial, en algunas regiones, a la problemática que enfrenta la producción de las diferentes clases comerciales de frijol en México. Aunque existen variedades que fueron liberadas para una región específica, algunas muestran amplia adaptabilidad y son cultivadas en diferentes regiones.

Además, las variaciones impuestas por el mercado y las condiciones ambientales provocan que los agricultores se aventuren a sembrar variedades de frijol que no muestran adaptación en la región. Lo anterior, hace necesaria la caracterización de variedades con lo que es posible considerar las ventajas y desventajas de utilizar una variedad en siembras comerciales de frijol, en una región dada. Por otra parte, el desconocimiento de algunas variedades y la recopilación de la información obtenida para cada una de ellas, ha provocado la falta de difusión para la siembra de variedades mejoradas y la subutilización de aquellas con potencial de rendimiento y agronómico, que pueda ser explotado en una o varias regiones productoras del país.

Se considera que la ampliación de la base genética del frijol en sus diferentes clases comerciales cultivadas en México, reduce los riesgos ocasionados por la vulnerabilidad a las enfermedades y otros factores limitantes de la producción que pueden interactuar y ocasionar pérdidas totales de rendimiento. Además, el conocimiento de los patrones de diversidad genética incrementa la eficiencia en la conservación del germoplasma de frijol y en el mejoramiento genético de la especie (Singh *et al.*, 1991a). Se han sugerido diferentes métodos para evaluar la diversidad genética presente en frijol. Entre estos puede considerarse la utilización características morfológicas (Miravete, 1945; Cárdenas, 1968; Singh *et al.*, 1991 a ,b y c; Hidalgo, 1991), bioquímicas (Singh *et al.*, 1991 a y c) y con el uso de marcadores genéticos moleculares (Beebe *et al.*, 2000; Metais *et al.*, 2000). Adicionalmente, en forma práctica se han realizado diferentes clasificaciones de las variedades de frijol con base en diferentes criterios entre los que sobresale el tipo comercial del grano y nivel de consumo de éste, el tipo de crecimiento, características morfológicas, fenológicas, reacción al fotoperiodo, etc. Con la utilización de estos métodos se ha buscado establecer la diversidad, ampliar la base genética y hacer cruzamientos más dirigidos, mediante la utilización de progenitores genéticamente distantes en el mejoramiento genético del frijol común.

Aunque la mayoría de las variedades han sido caracterizadas y clasificadas anteriormente, estas caracterizaciones y clasificaciones no se han realizado con base en criterios uniformes y en ninguno de ellos se ha incluido a todas las variedades. Además, para efectos de registro y protección varietal se han propuesto nuevas normas de caracterización, como las propuestas por la Unión Internacional Para la Protección de Variedades de Plantas (Union Internationale Pour la Protection des Obtentions Vegetales; UPOV). Esta caracterización es específica e incluye características cualitativas y cuantitativas del tipo morfológico de la planta y la semilla, además de que se considera la reacción al ataque de algunas enfermedades (UPOV, 1994).

En los últimos años, el uso de marcadores morfológicos, en la caracterización de variedades, ha sido complementado o sustituido por la evaluación de las relaciones genéticas basadas en los marcadores genéticos moleculares. Éstos últimos, han demostrado ser una importante herramienta para la identificación varietal, son menos influenciados por el ambiente, por la fenología de la planta y han resultado superiores para la distinción entre

variedades que incluso muestran morfología similar (Beebe *et al.*, 2000). Los marcadores genéticos moleculares son secuencias distintivas de ADN, cuya variación o polimorfismo es útil en la caracterización y clasificación de la diversidad genética (Valadéz y Khal, 1997).

Con base en lo anterior, es necesaria la evaluación de la diversidad genética existente en el germoplasma mejorado de frijol liberado en México. Para lograrlo, se deben evaluar todas las variedades mejoradas de frijol desarrolladas por el INIFAP y algunas obtenidas por otras instituciones, ya que algunas de ellas han sido y son utilizadas en siembras comerciales de frijol; así como en el mejoramiento genético. Algunas de estas variedades han mostrado ser del agrado de los productores y consumidores de frijol, e incluso han dado su nombre a las clases comerciales de mayor importancia como es el caso de Negro Jamapa, Azufrado, Mayocoba, Peruano, etc. Por ello, es necesario caracterizar e integrar la información de interés de cada una de las variedades mejoradas de frijol, con el fin de determinar el grado de amplitud de la base genética presente en cada clase comercial, para la protección varietal, establecer la factibilidad de uso de una variedad en una o varias regiones y evaluar el avance genético para el mejoramiento de los caracteres agronómicos de mayor importancia, como son el rendimiento, la adaptación y la tolerancia a factores adversos.

El análisis integral de la información generada para las diferentes variables evaluadas en cada una de las variedades mejoradas, permitiría evaluar su posible recomendación y el impacto que se tendría con su uso en la producción del frijol de nuestro país; así como el beneficio que proporcionaría a los productores y consumidores de esta leguminosa.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo General

- Evaluar la diversidad genética presente en el germoplasma mejorado de frijol común liberado en México, con base en características morfo-agronómicas y con el uso de marcadores genéticos moleculares ISSRs (Inter-secuencias simples repetidas).

1.1.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar un grupo de 120 variedades de frijol, con base en características morfo-agronómicas recomendadas por las normas internacionales para la distinción, uniformidad y estabilidad varietal.
- Establecer el grado de relación genética entre las variedades generadas en cada una de las clases comerciales de frijol cultivadas en México, con base en marcadores genéticos moleculares.

1.1.3. Hipótesis

- Algunas características morfo-agronómicas y marcadores genéticos moleculares pueden ser utilizados para la caracterización y clasificación del germoplasma mejorado de frijol común liberado en México.
- El mejoramiento genético ha permitido la modificación de algunas de las características morfo-agronómicas en las variedades mejoradas de frijol; sin embargo, es posible encontrar relación entre éstas y el lugar de origen de los progenitores.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. Origen y Distribución del Frijol Común

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los cultivos de importancia mundial originarios de América (Acosta *et al.*, 2000) y en la actualidad se ha reconocido a México como uno de los dos centros primarios de diversidad de esta especie (Singh *et al.*, 1991 a, b y c; Voysest, 2000). El germoplasma de frijol procedente de México es una fuente de variabilidad genética para diferentes características y ha sido usado recurrentemente en múltiples programas de mejoramiento genético de la especie, en todo el mundo (Rosales *et al.*, 2001).

Entre las especies cultivadas, el frijol común (*P. vulgaris* L.) es el que muestra uno de los mayores niveles de variabilidad genética en hábitos de crecimiento, tamaño y color de semilla, ciclo biológico y otros caracteres (Singh *et al.*, 1991 a, b y c). La distribución de la variabilidad genética en el frijol cultivado puede atribuirse principalmente a la domesticación múltiple y en menor grado al entrecruzamiento entre las formas silvestres y las cultivadas (Gepts y Debouck, 1991). En México, la variación en las preferencias de los consumidores ha permitido conservar la diversidad genética en frijol (Rosales *et al.*, 2001). En la actualidad el frijol se encuentra distribuido para su siembra en múltiples países. Entre 1992-1995 los principales productores de frijol en el mundo fueron la India, Brasil, México, China, Estados Unidos, Gran Bretaña, Italia, España y Francia. Como puede apreciarse la importancia del frijol en el contexto mundial se ha incrementado por sus características alimenticias, agronómicas y su importancia económica para exportación.

2.2. Taxonomía del Frijol

El frijol pertenece al género *Phaseolus*, asignado por Linneo en 1753. Para su estudio el frijol se clasifica de la siguiente forma (Miranda, 1967; Cárdenas, 1984; Martínez, 1998).

Reino: Vegetal

División: Espermatophyta (Embryophyta)

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Dicotyledoneae

Subclase: Diapétalas

Orden: Rosales

Familia: *Leguminosae* = *Fabaceae*

Subfamilia: *Papilionoideae*

Tribu: *Phaseoleae*

Subtribu: *Phaseolinae*

Género: *Phaseolus*

Especie: *P. vulgaris* L.

Aunque dentro del género *Phaseolus* se han descrito más de 50 especies, de las cuales la mayoría son silvestres y de origen americano, sólo cuatro fueron domesticadas. Las especies domesticadas son conocidas con el nombre genérico de frijol, pero comúnmente se agrega otra palabra que hace más específica la denominación; así se tiene el frijol común (*Phaseolus vulgaris*), frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*), frijol lima (*Phaseolus lunatus*) y frijol teparí (*Phaseolus acutifolius*). Estas especies tienen como centro primario de origen el área de México, América Central y Suramérica (Hidalgo, 1991).

2.3. Importancia del frijol

2.3.1. Económica

En la actualidad la población mexicana consume en promedio 15 kg de frijol por persona, al año (Castellanos *et al.*, 1997), lo que genera un requerimiento anual cercano a un millón 500 mil toneladas. La superficie promedio sembrada con frijol en México en los últimos años es de 2.2 millones de hectáreas anuales (Ortiz, 1998) y aunque la superficie de siembra no muestra fuertes fluctuaciones, a través de los años, las cifras de producción muestran fuertes variaciones, cuya amplitud llega a superar las 600 mil toneladas (INIFAP, 1998).

Por su utilidad práctica y su versatilidad biológica, el frijol es sembrado en prácticamente en todos los estados del país, bajo diferentes sistemas de cultivo (Acosta *et al.*, 2000). Las fluctuaciones en producción son debidas a que el 88% de la superficie sembrada con frijol en el país se ubica en áreas de temporal (INIFAP, 1998), donde se obtiene un rendimiento medio de 507 kg ha⁻¹ (Ortiz, 1998) y la producción de frijol, y otros cultivos, es de alto riesgo. Por lo anterior, México produce anualmente de 0.9 a 1.3 millones de toneladas de frijol, cuyo valor representa el 4.9% del producto interno bruto del sector agrícola; en esta producción participan unos 400,000 productores, con una superficie promedio de cinco hectáreas por productor (INIFAP, 1998).

La producción en la mayoría de los años no es suficiente para satisfacer la demanda interna lo que genera repuesta diferencial entre las distintas regiones del país; así, mientras que el Norte-Centro es la mayoría de los años exportador de esta leguminosa, otras regiones son importadoras (Acosta *et al.*, 2000). En años cuando la producción nacional no cumple con la demanda generada por la población mexicana se recurre a importaciones de grano de otros países, con la consecuente pérdida de divisas y la dependencia que esto implica (Acosta y Rosales, 1997).

2.3.2. Importancia alimenticia y social

México es el segundo país consumidor de frijol en América Latina, superado únicamente por Brasil (Shellie-Dessert and Bliss, 1991). Esta leguminosa, alcanza el segundo lugar en importancia en México al considerar la superficie de siembra y el volumen de consumo, por lo que ocupa junto con el maíz una posición de primer orden en la alimentación mexicana (Reyes y Paredes, 1993), ya que ambos aportan prácticamente la totalidad de las proteínas que consumen los estratos sociales de más bajos ingresos (INEGI, 1988).

Para la economía campesina el frijol, como sistema-producto, es una importante fuente de ocupación, de ingreso y de alimentación. En México el frijol se siembra en todas las entidades federativas, en una superficie total promedio de 2.2 millones de hectáreas (Ortiz, 1998) las cuales en su proceso de producción ocupan 2.7 millones de jornales lo que implica una importante derrama económica (INIFAP, 1998).

El grano del frijol se consume en una gran variedad de formas, además de ser demandado en varias clases comerciales, por lo que prácticamente cada localidad de México tiene diferente preferencia de consumo que varían con respecto al color, forma, tamaño y brillo del grano. En la región Noreste y Norte Centro la principal clase comercial que se consume es el tipo pinto, seguida por la clase bayo, los tipos flor de mayo y flor de junio que aunque no son clases dominantes, si representan una proporción significativa en las preferencias de consumo. En el Noroeste, la principal clase es la del tipo azufrado y se siembran otras clases comerciales que son utilizadas para exportación dentro del territorio nacional e internacional. En la región Centro se consumen prácticamente todas las clases comerciales y en el Sur la mayoría de la población consume el frijol negro (Castellanos *et al.*, 1997).

En cuanto a la frecuencia de consumo de frijol, más del 57% de los consumidores en el país tienen el hábito de comer esta leguminosa los siete días de la semana, al menos una vez al

día. Por otro lado, el consumo anual se estima entre 13 a 15 kg por habitante (Castellanos *et al.*, 1997).

2.4. Mejoramiento Genético en México

Antes de iniciar un programa de mejoramiento genético se debe de establecer el grado y la disponibilidad de la variación genética presente en la especie, la que debe ser caracterizada y utilizada sistemáticamente, para dar solución a los diferentes factores que reducen la producción del frijol en México. Los principales factores que causan pérdidas de rendimiento en las diferentes regiones productoras de frijol en México son las enfermedades, la sequía, la reducida utilización de insumos y el ataque de los insectos (Acosta *et al.*, 2000). Los factores anteriores, solos o combinados, hacen que la agricultura de cada región muestre variación en cuanto al nivel de riesgo, y se considera que la región de mayor incertidumbre es el Altiplano Semiárido.

El mejoramiento genético es un proceso sistemático que representa una de las mejores opciones e inversiones para incrementar y estabilizar el rendimiento, a pesar del costo y tiempo requerido para el desarrollo de nuevas variedades (Singh, 1985) que sean resistentes a la sequía, a las enfermedades o a otros factores adversos de la producción que inciden en las diferentes regiones productoras de frijol en México. Debido a las diferentes condiciones ecológicas en las que se cultiva frijol en el país, las diferentes combinaciones de los factores que reducen el rendimiento y la preferencia de los consumidores, en el INIFAP existe un programa de mejoramiento genético en cada una de las regiones productoras de frijol que son: Altiplano Semiárido (Durango, Dgo.), Templada Subhúmeda (Texcoco, Edo. de México), Trópico Seco (Los Mochis, Sinaloa) y Trópico Húmedo (Cotaxtla, Veracruz).

En general, en todos los programas de mejoramiento genético de frijol del INIFAP se sigue un esquema de mejoramiento similar que incluye: la introducción de germoplasma de diferentes fuentes; Bloque de cruzamientos: en el que se recombinan las características sobresalientes de los padres seleccionados tomando en cuenta la habilidad combinatoria y otros factores genéticos, de éstos. Posteriormente, se realiza selección en poblaciones segregantes, dentro y entre familias y líneas. En la mayoría de los programas de mejoramiento genético de frijol en México, para la obtención de familias y líneas, se realiza la selección de individuos en generaciones tempranas (F_2 o F_3). Posteriormente, se

realiza selección individual o masal en generaciones intermedias (F_4 a F_6) y avanzadas (F_7 en adelante).

Los criterios para la selección en generaciones tempranas se basan en características de alta heredabilidad, como lo son: la sanidad, ciclo biológico, tipo de grano y el vigor general de la planta. En generaciones intermedias y avanzadas, se da mayor importancia al rendimiento. Después de concluir con el proceso de selección se inicia el incremento de la semilla de las líneas sobresalientes, su validación comercial en campos de agricultores y su registro como variedades comerciales.

2.4.1. Métodos de mejoramiento

El frijol por ser una planta autógama, puede ser mejorada por los métodos de introducción, selección y por cruzamiento o recombinación. El éxito de un programa de mejoramiento genético depende de la variabilidad genética, de la habilidad combinatoria y sobre todo de la aplicación correcta de los métodos de mejoramiento. Los métodos más utilizados en el programa de frijol son la selección en germoplasma introducido, en variedades criollas y en poblaciones segregantes formadas por cruzamiento artificial.

2.4.1.1. Método de introducción

Consiste en introducir, en una localidad, líneas o variedades que han sido desarrolladas en otras regiones; si al evaluarlas en la región receptora, algunas resultan sobresalientes, pueden liberarse como variedades mejoradas. Una variedad mejorada puede ser considerada como introducida si se deriva por selección, masal o individual, de variedades introducidas. El tamaño de las pruebas de campo, llevadas en este método, depende en gran parte del número de introducciones y de la cantidad de semilla disponible. Algunos ejemplos de variedades obtenidas con este método son las variedades de tipo alubia Choqui 96 y Mariam 96, liberadas en la región del Trópico Seco.

2.4.1.2. Selección

Este método ha sido el más eficaz para obtener variedades mejoradas de frijol, por la gran variabilidad genética que existe en las variedades criollas y mejoradas, locales e introducidas, de este cultivo. La selección puede realizarse en variedades criollas, germoplasma introducido, poblaciones segregantes derivadas de cruzamiento artificial y en familias o líneas que muestren variación en los caracteres de interés. Dependiendo del grado de variabilidad genética se puede realizar selección individual o masal.

La selección individual consiste en separar de una población (variedad criolla o introducida, población segregante, etc.) la mejor o mejores plantas, sembrar la semilla de cada planta en un surco por separado, evaluar su descendencia (prueba de progenie) y cosechar en masa cada una de las mejores progenies. El método de selección individual tiene la finalidad de obtener nuevas variedades a partir de líneas puras (Lépiz y Navarro, 1983). La descendencia de cada una de las plantas seleccionadas y sembradas constituye una línea pura. Las líneas así seleccionadas se evalúan en ensayos de rendimiento para escoger la(s) más productiva(s) y liberarla(s) como nueva(s) variedad(es).

La selección masal consiste en escoger de una población todas las plantas superiores con características similares, cosecharlas y mezclar la semilla. La mezcla resultante se denomina selección masal. El objetivo de este tipo de selección es el de purificar, uniformizar o depurar una variedad que muestra variación por mezcla de líneas, por cruzamiento natural o mutaciones. Con este método no se producen variedades genéticamente homogéneas, lo cual también puede ser una ventaja ya que este tipo de germoplasma muestra buena producción y estabilidad al variar las condiciones ambientales.

2.4.1.2.1. Selección en variedades criollas

Este tipo de selección se ha realizado mediante el método masal, individual o la combinación de ambos, aplicada sobre diferentes variedades criollas. Posteriormente, se utilizó la selección individual en variedades criollas y la combinación de líneas derivadas de este tipo de selección, para la formación de compuestos multilíneas. Los compuestos y líneas obtenidos por este método son incluidos en los ensayos de rendimiento antes de iniciar el proceso de liberación como variedades comerciales.

En general las colectas, hechas tanto en los mercados como en los campos de los agricultores, son mezclas de diversos genotipos, no obstante su aparente uniformidad en el color y forma de la semilla. Si la variación fenotípica es baja, se aconseja emplear el método de selección masal con el que se pueden generar variedades mediante la selección en masa de todas las plantas que muestren uniformidad, o bien descartando de la población todas aquellas que difieran. Algunos ejemplos de variedades obtenidas con este método son Negro Puebla, Flor de Mayo, Negro Veracruz, entre otras.

Compuestos multilíneas: Una variante de la selección en variedades criollas es conocida como compuesto multilínea, que se utilizó en diferentes programas de mejoramiento de

frijol en México. Esta modificación consiste en la combinación de la selección individual y masal, ya que en este caso se cosecha por separado las plantas seleccionadas y en un segundo ciclo se realiza una prueba de progenie. Es decir se siembra planta por surco para evaluar la descendencia de cada planta seleccionada y se elimina las que muestran segregación y/o características indeseables. Las plantas (líneas en este caso) que muestren buenas características, se cosechan y se mezcla su semilla, lo que puede considerarse como una selección masal con prueba de progenie.

Una variación de este método consiste en seleccionar individuos en las poblaciones de plantas de variedades criollas o en poblaciones segregantes. Los individuos seleccionados son introducidos a los viveros de observación en los que son sometidos a pruebas de rendimiento mediante la siembra de planta por surco. Después de esto se mezclan las 10 o 15 líneas cuyo rendimiento sea similar y que además posean el mismo tipo de planta, reacción a las enfermedades y el mismo tipo de semilla. Este método ha dado lugar a variedades de importancia nacional e internacional como lo es la variedad Jamapa, liberada inicialmente en la región del Trópico Húmedo.

La multilínea es la mezcla de líneas puras emparentadas que difieren en un solo gene o un grupo específico de genes; mientras que una línea pura es la población descendiente de la autofecundación de una planta homocigótica. Las líneas puras son extraídas de variedades criollas mezcladas genéticamente o bien pueden provenir de selecciones individuales derivadas de poblaciones generadas por recombinación o hibridación entre líneas o variedades.

2.4.1.3. Cruzamiento y selección

El cruzamiento o recombinación, seguida de selección, es la metodología que ha dado mejores resultados para la generación de variedades de frijol en la región Centro y en otras regiones del país. La recombinación genética o cruzamiento, entre líneas o variedades, es realizada para complementar los caracteres deseables, con el fin de obtener líneas con características agronómicas superiores y con valor comercial. Algunos ejemplos de variedades obtenidas con este método son Bayo Mecentral, Flor de Durazno, Pinto Mestizo y Negro Altiplano.

En algunos casos, se ha utilizado el retrocruzamiento para introducir caracteres agronómicos en variedades comerciales y recuperar el tipo de grano comercial de las

variedades originales. Un ejemplo del método de mejoramiento por retrocruzamiento es la variedad Bayomex.

En el programa de mejoramiento de frijol del INIFAP se han realizado, en su mayoría, cruzamientos entre variedades cultivadas y sólo se han obtenido algunos cruzamientos de las formas cultivadas con sus parientes silvestres (Acosta *et al.*, 1999). La selección individual es la principal característica del método genealógico o pedigrí, que es el más utilizado en la mayoría de los programas regionales de mejoramiento genético de frijol en México.

Después de generar la variabilidad genética mediante la recombinación artificial, es necesario el avance por autofecundación hasta la generación F_2 . En esta generación se observa la máxima amplitud de variación fenotípica en las poblaciones segregantes. Para la obtención de familias y líneas, se realiza la selección de individuos en generaciones tempranas (F_2). Posteriormente, se realiza la prueba de progenies planta por surco en los viveros de observación y dependiendo del nivel de segregación se puede realizar selección entre y dentro de familias en generaciones intermedias (F_5 a F_6). Se ha observado que el método de selección individual es muy efectivo para obtener líneas uniformes para características agronómicas como precocidad, tipo de planta, reacción a enfermedades, etc., aunque en el caso de las líneas derivadas de cruzamientos con múltiples progenitores, o padres muy distantes genéticamente, es posible observar segregación para diferentes caracteres aún en generaciones avanzadas (F_7 en adelante).

Los criterios para la selección en generaciones tempranas (F_2 o F_3) se basan en características de alta heredabilidad, como lo son: sanidad, ciclo biológico, tipo de grano, carga de vainas y el vigor general de la planta. En generaciones intermedias y avanzadas (F_4 en adelante), se da mayor importancia al rendimiento. Este método es el que ha dado lugar al mayor número de variedades mejoradas de frijol en México, en el que es muy importante someter a las mismas condiciones de competencia el material que se va a seleccionar, sobre todo cuando se trata del mejoramiento para rendimiento, tipo de planta y altura de las vainas.

La evaluación de líneas experimentales provenientes de los diferentes métodos de mejoramiento, en ensayos uniformes de rendimiento, permite identificar aquellas con

adaptación específica o con amplia adaptación y estabilidad en el rendimiento, a través de localidades y años.

Con este método se ha logrado la obtención de variedades mejoradas, algunas de las cuales han sido del agrado del agricultor y el consumidor. Además, del INIFAP otras instituciones de investigación, enseñanza y de venta de semillas, han resultado beneficiadas con la liberación de variedades mejoradas de frijol, con buenas características agronómicas. El Programa Nacional de Frijol del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ha desarrollado más de 120 variedades de frijol para las diferentes regiones productoras de frijol en México (SARH, 1987 y SAGAR, 1998). Las variedades generadas muestran mayor potencial de rendimiento y otras características agronómicas que han permitido incrementar y estabilizar el rendimiento de grano obtenido con frijol en México.

2.5. Variedades Mejoradas de Frijol en México

El producto económico del mejoramiento genético son las nuevas variedades mejoradas de las que cada una son poblaciones de plantas cultivadas, relacionadas genéticamente y con características comunes. Algunos autores consideran que una variedad específica puede ser distinguida de otras con base en características morfológicas, el rendimiento, características agronómicas y con los marcadores genéticos moleculares (Cooke, 1998). Las características morfológicas (altura, hábito de crecimiento, color y tamaño del grano, color de flor, ciclo biológico y otras) pueden ser fácilmente distinguibles, mientras que el potencial de rendimiento y otras características fisiológicas son más difíciles de apreciar, debido a que son modificadas por el ambiente de producción.

2.6. Clasificación del Germoplasma de Frijol

La recopilación de la información que permita la clasificación y la estimación de la diversidad genética del frijol es esencial en el mejoramiento y la preservación del germoplasma en las diferentes especies del género *Phaseolus*. En la actualidad existen diferentes métodos para clasificar y determinar la diversidad genética presente en el germoplasma de frijol. Entre estos métodos se encuentra la información genealógica, las características comerciales, agronómicas y morfológicas. Adicionalmente, se puede utilizar diferentes tipos de marcadores genéticos moleculares que permiten la comparación directa

de la similitud de genotipos al nivel del ADN o Ácido Desoxiribonucleico, (Lübberstedt *et al.*, 2000).

2.6.1. Características morfológicas

Es innegable la importancia que reviste un trabajo de caracterización y clasificación, tanto en las formas cultivadas como en las silvestres, para su utilización más específica y dirigida en el mejoramiento genético del frijol. Desde siglos anteriores, se han realizado intentos para clasificar la variabilidad genética existente en el cultivo del frijol en sus diferentes especies. La mayoría de las clasificaciones han sido realizadas con base en características morfológicas de la semilla o la planta. En 1945 Miravete, con el uso del método de Gams, fue uno de los primeros que trataron de clasificar los diferentes tipos de frijol en México. El método usado se basa principalmente en la forma de la semilla y con base en esta característica se diferenciaron siete grupos de los cuales el más común en nuestro país es el que tiene semillas de tipo elíptico con un 54.2 % de las variedades (Cárdenas, 1968).

En 1951 después de evaluar 495 colecciones en las que se buscó representar todos los tipos de frijol, existentes en México, se distinguieron cinco grupos de la especie *P. vulgaris* y uno de la especie *P. coccineus*. La distinción de grupos se efectuó con base en las características del grano (forma, color, tamaño, peso, volumen, densidad), de la planta (hábito de crecimiento, cantidad de follaje, ramificaciones, color del tallo, color de las hojas, tamaño de las hojas, tamaño del pecíolo y el raquis, color de flor), de las vainas (abundancia, longitud, anchura, grosor, curvatura de la punta del ápice, dehiscencia, número de granos por vaina), precocidad y la reacción a plagas y enfermedades (Cárdenas, 1968 y 1984).

En un estudio en el que se evaluó descriptores o características morfológicas en un grupo de 1000 colectas de *P. vulgaris*, para realizar un análisis de componentes principales, se encontró que solo tres factores o componentes fueron necesarios para explicar el 83 % de la variabilidad total presente en las colectas evaluadas. Derivado de éste y otros estudios el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) propuso una lista de 25 descriptores (Hidalgo, 1991). En otro estudio con variedades de frijol con grano de tipo negro, en el que se evaluaron características morfológicas en combinación con isoenzimas, se observó que el agrupamiento de las poblaciones fue determinado principalmente por el tamaño de la semilla, el hábito de crecimiento y la precocidad. Lo anterior, permitió diferenciar dos

grupos con base en las variaciones observadas, las que fueron corroboradas por el análisis isoenzimático, aunque se observaron algunas inconsistencias en los resultados obtenidos (Avendaño, 2001).

En otros estudios se ha demostrado que la utilización de padres morfológicamente diferentes no es suficiente para lograr mayor eficiencia en el mejoramiento genético del frijol. Lo anterior, debido a que algunas variedades que muestran similitud morfológica pueden ser genéticamente distantes y el caso contrario es que el uso de variedades aparentemente diferentes ha llevado al cruzamiento entre padres muy emparentados. Estos trabajos de caracterización y agrupamiento del germoplasma de frijol se han realizado mediante el uso de características morfológicas de la semilla y la planta, patrones isoenzimáticos y de phaseolina para el agrupamiento en acervos y razas genéticas. Con base a lo anterior, se ha establecido que el germoplasma de frijol de México, perteneciente al acervo genético Mesoamericano, ha sido clasificado en tres razas genéticas (Singh, 1991b) que son: la raza Durango, la Mesoamérica y la Jalisco.

2.6.2. Características del grano

Una de las principales formas de caracterización del frijol es la que se realiza con base en la preferencia por parte de los consumidores. La desaparecida Comisión Nacional de Subsistencias Populares (CONASUPO) con base en el nivel de demanda clasificó las variedades producidas en México (Cuadro 2), en altamente preferentes entre los que se cuentan los tipos flor de mayo, flor de junio, negro jamapa, azufrado, mayocoba, peruano; preferentes: pinto, garbancillo, negro brillante, manzano, etc. y no preferentes, entre los que se encuentran los tipos ojo de cabra y la mayoría de los tipos apreciados únicamente áreas muy localizadas.

Aún después de la desaparición de la CONASUPO, los grandes comerciantes de la actualidad toman en cuenta la clasificación antes mencionada para la comercialización del frijol. Por lo que en el mejoramiento genético también se considera dicha clasificación, con el fin de obtener variedades mejoradas principalmente dentro de las clases comerciales preferentes y altamente preferentes. Para lograrlo, se ha utilizado el germoplasma disponible que muestra los caracteres de interés y se realizan recombinaciones con las que sea posible recuperar la clase comercial de grano.

Cuadro 1. Clasificación de variedades de frijol para su comercialización en México.

Altamente Preferentes	Preferente	No Preferentes
Flor de Mayo	Garbancillo	Bayo Berrendo
Azufrado	Pinto Nacional	Bayo Blanco
Mayocoba	Negro San Luis	Bayo Río Grande
Peruano	Manzano	Ojo de Cabra
Flor de Junio	Negro Querétaro	Pinto Mexicano
Negro Jamapa		Sataya

Fuente: CONASUPO

2.6.3. Otras formas de clasificación

Para efectos de registro y protección de variedades de frijol, el Sistema Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS), de México, actualmente tiene como requisito la caracterización varietal con base en el listado de características propuesto por la Unión Internacional Para la Protección de Variedades de Plantas (conocida con el acrónimo en francés; UPOV). Esta caracterización es específica para cada variedad e incluye características cualitativas y cuantitativas de tipo morfológico, de la planta y la semilla, además de que se considera la reacción al ataque de algunas enfermedades (UPOV, 1994).

2.6.3.1. Caracterización con base en marcadores genéticos moleculares

Un marcador genético es una banda de Ácido Desoxiribonucleico (ADN) que puede estar asociada con un carácter agronómico presente en las plantas, o también, es cualquier gene cuya expresión permite un efecto fenotípico que se puede detectar fácilmente; por ejemplo, un gene que proporciona resistencia para alguna plaga o enfermedad, factor ambiental adverso, etc. (Khush y Kinoshita, 1991).

Las principales aplicaciones de los marcadores de ADN en el mejoramiento de plantas son: la identificación varietal (Valadéz y Kahl, 1997), la medición de la diversidad genética, identificación de fuentes de genes para el mejoramiento, estimación de la tasa de entrecruzamiento, análisis de paternidad o determinación de parentescos, cálculo de la heterogeneidad en líneas, determinación de la pureza genética de lotes de semilla,

identificación de variedades, para protección y obtención de patentes de variedades (Sahagún, 1997; Cooke 1998; Kelly, 1998; Smith *et al.*, 2000).

Las propiedades mencionadas permiten establecer que los marcadores genéticos moleculares son extremadamente útiles y más efectivos, comparados con los análisis morfológicos o de proteínas (isoenzimas y aloenzimas), las que generalmente muestran un bajo número de loci polimórficos (Senior, 1996). Sin embargo; se considera que para establecer la variación existente en una especie, entre variedades y dentro de cada variedad, es necesario evaluar en forma combinada un alto número de caracteres y establecer las posibilidades de su uso en la distinción, uniformidad y estabilidad en diferentes cultivos. Entre estos métodos se incluyen características morfológicas, agronómicas y datos moleculares (UPOV, 1997).

Existen diversas técnicas de marcadores genéticos moleculares, como RFLPs, RAPDs, AFLPs, Microsatélites o SSRs, y los ISSRs (Cooke, 1998; Lübberstedt *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000), que han sido evaluados extensivamente en la determinación de la diversidad genética en sorgo (Ahnert, *et al.*, 1996; Dean *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1996), trigo (Castagna *et al.*, 1994) y en frijol común a diferentes niveles (Beebe *et al.*, 2000; Metais, 2000); así como en la generación de mapas de ligamiento en Soya (Akkaya, *et al.*, 1995) y maíz (Senior, 1996).

La elección de una técnica para generar alguna clase de marcador genético molecular depende de muchos factores, primero se debe considerar los objetivos y/o alcances de trabajo. Para lo anterior, se debe considerar los recursos económicos y equipo disponibles, el tipo de población a evaluar, la cantidad de material biológico disponible y la complejidad de cada técnica, con el fin de seleccionar la más adecuada para el cumplimiento de los objetivos de la investigación.

2.6.3.1.1. Inter-secuencias simples repetidas (ISSRs)

Las ISSRs son iniciadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que aprovechan las múltiples secuencias simples repetidas (SSR), asociadas con loci, distribuidas en el genoma. Las ISSRs, en contraste con las SSRs, no requieren el conocimiento previo de la secuencia de ADN (Cooke, 1998). Las inter-secuencias simples repetidas se anclan a una SSR particular, son utilizadas para amplificar el ADN entre dos secuencias opuestas y los polimorfismos ocurren cuando un genoma tiene ausente una de

las ISSRs o tiene una inserción-delección que modifica la distancia entre repeticiones (Ramakrishna *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1996; Kojima *et al.*, 1998). Las ISSRs usan primers que son complementarios con las SSR, pero también contienen de una a tres bases de oligonucleotidos y se anclan en los extremos 3' y 5' (Albani y Wilkinson, 1998).

Las ISSRs han sido utilizadas con primers diferentes, en longitud de repetición y de ancla, para generar perfiles varietales y se han convertido en una importante herramienta que con los primers apropiados, puede ayudar a obtener altos niveles de discriminación, aún entre variedades relacionadas (Cooke, 1998). La huella genómica obtenida con las ISSRs puede usarse en las comparaciones taxonómicas y filogenéticas en un amplio espectro de organismos. En arroz las ISSRs han sido utilizadas con éxito para determinar la variabilidad genética y para la rápida identificación de variedades, lo que las convierte en un marcador molecular que puede ser utilizado en la caracterización de un alto número de accesiones de este cultivo (Blair *et al.*, 1999). Estos marcadores genéticos moleculares pueden ser utilizados para encontrar bandas asociadas con genes mayores y menores relacionados con características agronómicas importantes en trigo (Ammiraju *et al.*, 2001). Además, las relaciones genéticas entre accesiones de trigo fueron similares cuando fueron analizados con las ISSRs, RFLPs y RAPDs, lo que en combinación con otras características como el polimorfismo, maniobrabilidad, etc., permiten recomendar la aplicación de las ISSRs en el análisis de genotipos y la producción de mapas genómicos en trigo (Nagaoka y Ogihara, 1997).

IZT.

Se ha demostrado que las ISSRs son rápidas, simples y muestran una mayor proporción de bandas polimórficas, con respecto a las obtenidas con otros marcadores genéticos moleculares como RAPDs (Quián *et al.*, 2001), y en un estudio, con 34 variedades de papa, sólo dos primers fueron necesarios y cada uno mostró la capacidad para distinguir entre cultivares (Prevost y Wilkinson, 1999). En frijol se encontró que sólo un primer, de los cinco estudiados, para las ISSRs fue eficiente en la generación de bandas polimórficas, y fue insuficiente para distinguir entre las 24 líneas evaluadas. En ese estudio los marcadores obtenidos con RAPDs y RFLPs fueron utilizados con éxito para determinar la diversidad genética entre las líneas; así como un adecuado agrupamiento de acuerdo con el origen geográfico y en casos particulares con respecto a sus creadores (Metais *et al.*, 2000).



Como puede apreciarse existen diferencias en los resultados obtenidos con el uso de los marcadores genéticos moleculares, por lo que es recomendable su validación en forma combinada con otros métodos para establecer su utilidad práctica según los objetivos del trabajo por realizar.

2.7. Métodos de Análisis y Presentación de Resultados

Los resultados obtenidos con las diferentes formas de caracterización morfo-agronómica y con marcadores genéticos moleculares pueden ser analizados por diferentes métodos. Una de las formas más comunes es la utilización del análisis de componentes principales, para determinar cuales son los valores que explican la mayor parte de la variabilidad y la asociación existente entre las variedades estudiadas (MSTATC,1993; Castagna, 1994).

Para la representación de los resultados obtenidos en los diferentes estudios de evaluación de la diversidad, con base en marcadores genéticos moleculares y con base en caracteres morfo-agronómicos, se usan diferentes técnicas. Éstas deben ser analizadas y presentadas en forma gráfica para reafirmar la idea de similitud o disimilitud entre variedades. Los métodos gráficos más comúnmente utilizados son los métodos de agrupamiento que consisten principalmente en ubicar una muestra de n objetos en un determinado número de grupos (G) con base en las observaciones de un determinado número (P) de variables.

Entre los métodos grupales, el más comúnmente utilizado es el método de agrupamiento por promedio aritmético no ponderado (UPGMA-Unweighted pair-group with arithmetical averages). Este método minimiza la distancia intergrupala, definida como la media de todas las distancias apareadas con base en todos los individuos del grupo. Los resultados obtenidos son representados en forma de diagramas como los árboles de agrupamiento o dendogramas. Los dendogramas son formas de sistemas nodales que sirven para representar visualmente las relaciones objeto/agrupamiento. Estos son generalmente producidos mediante el agrupamiento jerárquico con base en una medida conveniente de distancia/similitud (UPOV, 1997).

III. MATERIALES Y METODOS

Para cumplir con los objetivos propuestos, se consideraron dos fases de trabajo. En la primera, se realizó la caracterización en condiciones de campo y en la segunda se determinó el grado de relación entre las variedades evaluadas. Esta determinación y el análisis del grado de diversidad genética, se realizaron con base en las características morfo-agronómicas evaluadas en campo y con el apoyo de marcadores genéticos moleculares.

3.1. Fase de Campo

3.1.1. Localización del área de trabajo

La siembra se realizó, en la localidad de Santa Lucía de Prías Edo. de México situada a los 19° 28' de latitud Norte y a los 98° 52' de Longitud Oeste. El sitio tiene una altitud sobre el nivel del mar de 2240 m, una media anual de temperatura de 15 °C y una precipitación promedio anual de 640 mm. El suelo es del tipo Feozem háplico (clasificación FAO) y el clima del sitio es del tipo templado, subhúmedo, con verano fresco, largo y con poca oscilación de temperatura Cb(wo) (w) (i')g (García, 1988).

3.1.2. Germoplasma utilizado

Esta etapa inició con la recopilación de la semilla de las variedades, obtenidas y liberadas en los diferentes centros de mejoramiento genético de frijol del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), del Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX) y del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas (CP). Se recopiló semilla de 120 variedades mejoradas, provenientes de diferentes regiones productoras de frijol en México (Cuadro 2). Las variedades Rayado Rojo y Promisorio 219 fueron liberadas por el ICAMEX, mientras que Negro Precoz y Negro Tardío fueron obtenidas en el Colegio de Postgraduados. El resto de las variedades fueron generadas y liberadas por el INIFAP.

Cuadro 2. Variedades de frijol liberadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y otras instituciones, para diferentes regiones del país.

Variedades	Variedades	Variedades	Variedades
Actopan	Bayo Durango	Flor de Mayo Sol	Negro San Luis
Agrarista	Bayo INIFAP	Garbancillo Supremo	Negro Sinaloa
Aguascalientes 466	Bayo Los Llanos	Jamapa	Negro Tacaná
Alubia Chica	Bayo Madero	Lagunero 87	Negro Tardío*
Amarillo 153	Bayo Mecentral 90	Manzano	Negro Veracruz
Amarillo 154	Bayo Rata	Mariam-96	Negro Zacatecas
Amarillo 155	Bayo Victoria	Matamoros 64	Ojo de Cabra 73
Antigua	Bayo Zacatecas	Negro 66	Ojo de Cabra 400
Arriaga	Bayomex	Negro 150	Peruano P80
Azufrado 100	Blanco 157	Negro 151	Pinto 133
Azufrado 200	Blanco Tlaxcala	Negro 152	Pinto 162
Azufrado Amarillo 33	Cacahuate 72	Negro 8025	Pinto 168
Azufrado Higuera	Canario 101	Negro Altiplano	Pinto Agabe
Azufrado Namiquipa	Canario 107	Negro Cotaxtla 91	Pinto Anzalduas 91
Azufrado Noroeste	Canario 72	Negro Chiapas	Pinto Bayacora
Azufrado Peruano 87	Canario 78	Negro Durango	Pinto Chihuahua
Mayocoba	Chivá Busera	Negro Frailesca	Pinto Fresnillo
Azufrado Regional 87	Choqui-96	Negro Huasteco 81	Pinto Laguna 80
Azufrado Tapatío	Delicias 71	Negro INIFAP	Pinto Mestizo
Bayo 66	Durango 222	Negro Mecentral	Pinto Mexicano 80
Bayo 107	Flor de Abril	Negro Medellín	Pinto Nacional
Bayo 158	Flor de Durazno 90	Negro Nayarit 80	P. Nal. JM Morelos
Bayo 159	Flor de Junio Ana	Negro Otomí	Pinto Villa
Bayo 160	Flor de Junio Criollo	Negro Pacífico	Promisorio 219**
Bayo 161	Flor de Junio Marcela	Negro Perla 90	Puebla 152
Bayo 164	Flor de Junio Victoria	Negro Precoz*	Rayado Rojo**
Bayo 400	Flor de Mayo	Negro Puebla	Río Grande
Bayo Alteño	Flor de Mayo Bajío	Negro Querétaro	Sataya 425
Bayo Baranda	Flor de Mayo M38	Negro Querétaro 78	Veracruz 268
Bayo Berrendo	Flor de Mayo RMC	Negro Sahuatoba	Villa Guerrero

* Generadas en el Colegio de Postgraduados y ** Liberadas por el ICAMEX.

3.1.3. Siembra

La siembra se realizó el día 6 de julio de 1999 y el 23 de mayo en el año 2000, después del establecimiento de la temporada de lluvias. La parcela experimental, en ambos años, consistió de un surco de seis metros con 70 cm de separación, con dos repeticiones por variedad. A la siembra, la semilla se depositó en el fondo del surco y se cubrió con tierra húmeda, con la ayuda del azadón. La densidad de población, que se estableció, fue de 10 a

13 plantas por metro lineal de surco. La precipitación acumulada durante el ciclo fue de 458 mm y la temperatura media de 16.7 °C en 1999 y en el 2000 se acumularon 613 mm de precipitación durante el ciclo y se observó una temperatura media de 16.9 °C.

3.1.4. Manejo agronómico

En ambos años se fertilizó el suelo con la dosis 30-30-00 (para nitrógeno, fósforo y potasio, respectivamente), aplicada al momento de la siembra. Para el control de malas hierbas se realizaron dos escardas complementadas con un deshierbe con azadón y se aplicó insecticida en dos ocasiones para el control de insectos plaga, como la conchuela (*Epilachna varivestis*) y el picudo del ejote (*Apion godmani*).

3.1.5. Caracterización con base en atributos morfo-agronómicos

3.1.5.1. Variables cuantificadas

Para fines prácticos, los atributos evaluados en este trabajo relacionados con la fenología, morfología y reacción a las enfermedades fueron designados con el nombre genérico de variables morfo-agronómicas. Para la evaluación de estas variables se tomó como base guías y escalas aceptadas internacionalmente (CIAT, 1987; UPOV,1994) y fueron:

3.1.5.1.1. Fenológicas

Días al inicio de Floración (DIF): registrada cuando el 50 % de las plantas, de cada variedad, presentó al menos una flor completamente abierta.

Días a Madurez Fisiológica (DMF): registrada cuando el 50 % de las plantas, de cada variedad, cambió del verde típico de la variedad hasta el amarillento de la madurez.

3.1.5.1.2. Reacción a enfermedades

Para la cuantificación de esta característica se utilizó la escala de 1 a 9 propuesta por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, 1987). Las lecturas fueron registradas durante el periodo de llenado de grano. Se evaluaron las enfermedades de mayor incidencia como la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), la roya (*Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*), el tizón común (*Xanthomonas axonopodis* = *campestris* pv. *phaseoli*) y el tizón de halo (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*).

3.1.5.1.3. Variables morfo-agronómicas

Como se explicó anteriormente, se evaluaron las características propuestas en la guía para conducir pruebas de distinción, uniformidad y estabilidad de la Unión Internacional para la

Protección de Nuevas Variedades de Plantas (Union Internationale Pour la Protection des Obtentions Vegetales; UPOV, 1994). Las características, son enlistadas en el Cuadro 2A del Apéndice.

Para la variable peso de 100 semillas (g) se consideró que las semillas eran pequeñas cuando pesaban menos de 25 g, medianas cuando pesaban entre 25 a 40 g y grandes cuando su peso fue superior a 40 g (CIAT, 1987).

Adicionalmente, en etapa de plántula se evaluó la coloración antocianínica que esta relacionada con la existencia de pigmento en el hipocótilo. Para ello, se utilizó el total de las plantas establecidas para cada variedad en cada repetición. Se registró la presencia o ausencia de la pigmentación y el color de ésta. En prefloración se evaluaron las características relacionadas con la hoja como son: color de la hoja, rugosidad, tamaño y forma del foliolo terminal. Para ello, se consideró de una a dos hojas compuestas completamente desarrolladas de todas las plantas de cada variedad.

En prefloración, floración y formación de vainas se evaluó y corroboró algunas características como: Hábito de crecimiento (I = Determinado arbustivo; II = Indeterminado arbustivo; III = Indeterminado postrado y IV = Indeterminado con guías trepadoras), altura de la planta (dosel y guía), inicio y velocidad de crecimiento de la guía. Para la medición de la altura se evaluaron 10 plantas con competencia completa en cada variedad y en cada repetición; mientras que para el resto de las características se evaluó el total de las plantas.

Al inicio de la etapa reproductiva se registró el tiempo de floración (en forma cualitativa), días a inicio de floración, localización de la inflorescencia, tamaño de la bráctea, color del estandarte y color de las alas. Para determinar el tiempo de floración y el número de días a la floración, se consideró que las variedades habían llegado a esta etapa fenológica cuando el 50 % de las plantas tenían una flor abierta. El resto de las variables fue evaluado en dos flores tomadas al azar de cada una del total de las plantas.

Las características relacionadas con las vainas fueron: Tamaño de la vaina, ancho, forma de la sección transversal, longitud del pico, presencia de hebras, textura de la superficie. Estas características fueron evaluadas en 10 vainas bien desarrolladas cortadas al azar en cada variedad y repetición. El tamaño fue determinado en forma visual y con la ayuda de una regla milimétrica. Además, se evaluó el color de la superficie, intensidad del color, pigmentación, color de la pigmentación, distribución de la pigmentación, curvatura, forma

de la curvatura, forma de la punta, presencia de apergaminado, grado de curvatura del pico y prominencia de los granos. Para la evaluación de estas variables se consideró una o dos vainas de cada una del total de las plantas.

En la etapa de formación y llenado del grano se evaluó el color del grano, únicamente en las variedades con grano de color blanco. Para ello se abrió cuidadosamente 10 vainas de cada una de las variedades y en cada repetición. Se registró la madurez fisiológica cuando el 50 % de las plantas de cada variedad llegaron al color amarillento típico de la madurez. Posteriormente, en la madurez de cosecha se evaluó el grado de apergaminado, las constricciones, la forma de la sección transversal y longitudinal de las vainas. Para ello se utilizó dos vainas bien formadas de cada una de todas las plantas en cada variedad.

Después de la cosecha se determinó el tamaño de grano en forma visual y en forma alterna se pesaron tres muestras de 100 semillas tomadas al azar de cada variedad. Además, se registró el color del grano y en aquellas variedades que tenían grano de varios colores se determinó el color principal, el número de colores secundarios, color principal secundario y distribución del color secundario. En el grano de todas las variedades se evaluó la presencia de venas, color del hilio, brillo, forma de la sección longitudinal de la semilla, grado de arriñonamiento y forma de la sección transversal. Para la evaluación de todas estas características se consideró el total de la semilla obtenida para cada variedad que fue superior a las 5000 semillas. Además, en tres muestras de 10 semillas tomadas al azar se evaluó el promedio para el largo, ancho y grosor de la semilla y en dos muestras de 10 vainas, por repetición, se determinó la media para el número de granos por vaina.

Las variables evaluadas en campo fueron utilizadas en el análisis estadístico para establecer la diversidad genética entre las variedades evaluadas, la que fue complementada con la evaluación con base en marcadores genéticos moleculares.

3.2. Fase de Laboratorio

3.2.1. Caracterización con base en marcadores genéticos moleculares

3.2.1.1. Colecta del material vegetal

En esta etapa se utilizaron sólo 95 variedades, ya que se descartaron algunas que mostraron estrecha similitud genética con base en la caracterización realizada en campo. Esta

actividad se efectuó durante la floración y consistió en coleccionar por separado 10 hojas jóvenes y sanas de cada variedad, las que se cortaron en la parte media del pecíolo con tijeras y se guardaron en bolsas de malla de fibra de vidrio previamente etiquetadas e identificadas por variedad. Estas bolsas se doblaron y se amarraron con ligas, para transportarlas al laboratorio en una hielera donde se cuidó que no hubiera contacto directo del hielo con el tejido foliar, para evitar el daño de éste último. Era importante mantener las muestras frías desde su corte en el campo hasta la llegada al laboratorio para su congelamiento, ya que el ADN es degradado rápidamente por enzimas endonucleasas, que se encuentran naturalmente en las células y enseguida de que el tejido se corta, éstas entran en acción.

3.2.1.2. Liofilizado y molienda

Este es un proceso de deshidratación del tejido por sublimación, que se inicia con el congelamiento de las muestras en nitrógeno líquido. Posteriormente, las muestras se transfirieron al liofilizador (Labconco Lyph lock 12), el cual debe encenderse con anticipación, para tener la cámara a temperatura baja ($-55\text{ }^{\circ}\text{C}$) y producir un vacío adecuado de alrededor de los 13 micrones. La deshidratación se tardó seis días y posteriormente se molieron las muestras en un molino eléctrico (Moulinex ®) hasta obtener un polvo fino, con la idea de que entre más fino fuera el polvo mayor sería la cantidad de ácido desoxirribonucleico (ADN) obtenido. Cada muestra se molió de forma individual y se envasó en frascos de plástico estériles y etiquetados. El tejido obtenido se guardó en el ultra-congelador ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta el momento de la extracción del ADN.

3.2.1.3. Extracción y aislamiento del Ácido Desoxirribonucleico (ADN)

Se extrajo el ADN del tejido liofilizado de cada una de las 95 variedades coleccionadas; mediante una modificación del método propuesto por otros investigadores (Saghai-Marooft *et al.*, 1984). El procedimiento de extracción del ADN se cita completo en el Anexo 7.1A. y la preparación de los reactivos utilizados en el Anexo 7.2A.

3.2.1.4. Cuantificación de la concentración y pureza del ADN

Después de la extracción del ADN, se evaluó la pureza y la concentración de los ácidos nucleicos de cada una de las muestras obtenidas; ya que si éste va contaminado los resultados no son confiables. La cuantificación de la pureza del ADN se realizó con luz ultra violeta a través de la absorbancia por los ácidos nucleicos (espectrofotometría), dicha

medición se efectúa a una longitud de onda de 260 nm. La evaluación del ADN, se efectuó en un espectrofotómetro DR/ 4000U (Hach ®) y la concentración se obtuvo mediante la fórmula:

$$[\text{ADN (ng/}\mu\text{l)}] = (\text{DO}_{260})(\text{FD})(50 \mu\text{g/}\mu\text{l})$$

Donde:

DO_{260} = Densidad óptica de la solución de ADN leída a la longitud de onda de 260 nm.

FD = Factor de dilución (1:50)

50 $\mu\text{g/}\mu\text{l}$ = una unidad de densidad óptica del ADN a 260 nm.

Valores entre 1.8 y 2.0, como los observados en este estudio, muestran un ADN con pureza suficiente para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.2.1.5. Procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El procedimiento para la PCR se realizó en un termociclador marca Techné PH2 enfriado por agua y se siguieron los pasos:

1. Mezcla de reacción: cada 20 μl de la reacción de amplificación consistieron de diferentes componentes cuyas cantidades y volúmenes son citados en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Cantidad y volumen de cada componente de la mezcla para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). INIFAP-CEVAMEX. 2000-2001.

Componente	Cantidad final	Volumen/muestra en μl
Agua bidestilada	-	11.3
Amortiguador de Taq	1 X	2.2
MgCl ₂	2.0 mM	0.8
Mezcla de dNTPs	187 μM	1.5
Enzima Taq	1 U	0.2
Iniciador	1.0 μM	2.0
ADN	20 ng	2.0
Volumen final	-	20.0

3.2.1.6. Programa de amplificación

El programa de amplificación estuvo compuesto por un ciclo inicial de amplificación de 94 °C por 4 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto para separar, 52 °C por un minuto de alineación, y 72 °C por 2 minutos de extensión; y un ciclo de extensión final de 72 °C por 5

minutos. Este programa fue usado con éxito en frijol, en otros estudios (Guillén *et al.*, 2000).

Cuadro 4. Iniciadores o primers utilizados en la determinación de la diversidad genética del germoplasma mejorado de frijol en México. INIFAP-CEVAMEX. 2000-2001.

Primer o iniciador	Secuencia 3'---- 5'
(TCC) 5 RY	TCCTCCTCCTCCTCCRY
WHVG (TG) 7	WHVGTGTGTGTGTGTGTG
(GA) 8 YC	GAGAGAGAGAGAGAGAYC
DBDA (CA) 7	DBDACACACACACACACA
(CA) 8 RT	CACACACACACACACART
(GT) 8 YG	GTGTGTGTGTGTGTGTYG
(AC) 8 YG	ACACACACACACACACYG

Tan pronto como concluyó el proceso de amplificación de las muestras de ADN, se retiraron del termociclador, se guardaron en refrigeración (± 4 °C), donde pueden permanecer por varios días sin sufrir alteración alguna, y se utilizaron para someterlas al último paso que es la separación de los fragmentos amplificados por electroforesis (Anexo 7.3.A.). En la electroforesis se utilizó gel de agarosa ultrapura (GIBCO) al 2%, el cual se visualizó con luz UV por tinción con Bromuro de Etidio (BrEt).

Cuando el colorante azul (buffer de carga), que sirve para monitorear el avance de los fragmentos del ADN, se encontraba a una distancia de por lo menos un centímetro de la orilla opuesta a los pozos del gel, se desconectó de la fuente de poder. El portageles con el gel se retiró para introducirlo en un recipiente, que contenía bromuro de etidio a concentración de $1\mu\text{g ml}^{-1}$, durante 20 minutos en oscuridad y agitación suave y constante. Después de este tiempo, el gel se enjuagó en una charola con agua destilada estéril por 10 minutos y se observó exponiéndolo a la luz UV en el transiluminador. Los resultados de la amplificación se archivaron en fotografías tomadas con una cámara instantánea Fotodyne® con película en blanco y negro y filtro naranja.

3.3. Análisis Estadístico

3.3.1. Datos de variables morfo-agronómicas

Con los datos obtenidos para cada una de las variables morfo-agronómicas evaluadas en campo, se realizó el análisis de componentes principales con la ayuda del programa estadístico Systat®. Con este programa se realizó un análisis previo en el que se incluyó las 72 variables evaluadas y fue utilizado para establecer la importancia relativa de cada variable, o grupos de variables, en la explicación de la varianza total observada en el grupo de variedades evaluadas. Diversas combinaciones de variables fueron probadas, hasta que se encontró el análisis de componentes principales en el que las variables seleccionadas tuvieron mayor peso en la explicación de la varianza encontrada en este estudio. Este análisis fue utilizado para establecer la importancia relativa de cada variable y el agrupamiento de las variedades evaluadas con respecto al análisis de éstas.

Además, se efectuó un análisis de grupos (Cluster) con la ayuda del paquete estadístico NTSYSpc Versión 2.02i ® (Rohlf, 1993). En este análisis se incluyó 59 de las 72 variables, descartando aquellas variables que mostraron poca información para la explicación de la varianza. Para el análisis se usó el sistema de análisis multivariado y taxonomía numérica, el que permitió realizar los cálculos de distancias genéticas entre los materiales con el programa de similitud para datos genéticos (SIMGEND). Posterior a esto, se construyó el dendograma por método de media aritmética no ponderada UPGMA (Unweighted pair-group method, arithmetic average) incluido en el subprograma secuencial aglomerativo jerárquico y de agrupamiento de anidamientos (SAHN Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested clustering method) (Rohlf, 1993).

3.3.2. Datos de marcadores genéticos moleculares

Las bandas observadas para cada iniciador, se codificaron mediante un código binario, asignando el valor de 1 a la presencia de una banda dada y 0 a su ausencia; formando así, una matriz de ceros y unos. Esta matriz fue usada para efectuar los análisis de estadística multivariada y taxonomía numérica el que permitió realizar los cálculos de distancias genéticas, mediante el uso del mismo paquete y especificaciones utilizadas con el análisis de variables agronómicas.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización Morfo-agronómica

La clasificación realizada con base en el color de grano permitió conocer el número de variedades mejoradas obtenidas, hasta el momento, dentro de cada clase comercial. Puede decirse que las clases comerciales de grano que cuentan con mayor cantidad de variedades mejoradas fueron las del tipo negro opaco pequeño (19) y negro brillante mediano (19); seguida por las clases comerciales bayo y pinto con 17 y 15 variedades, respectivamente (Figura 1).

Existen algunas clases comerciales que aunque son de gran importancia en el mercado nacional, cuentan con un reducido número de variedades como son las clases flor de mayo, azufrado y peruano. Además, algunas clases como el tipo río grande, manzano y jaspeado de rojo (conocido como flor de abril), cuentan con solo una variedad.

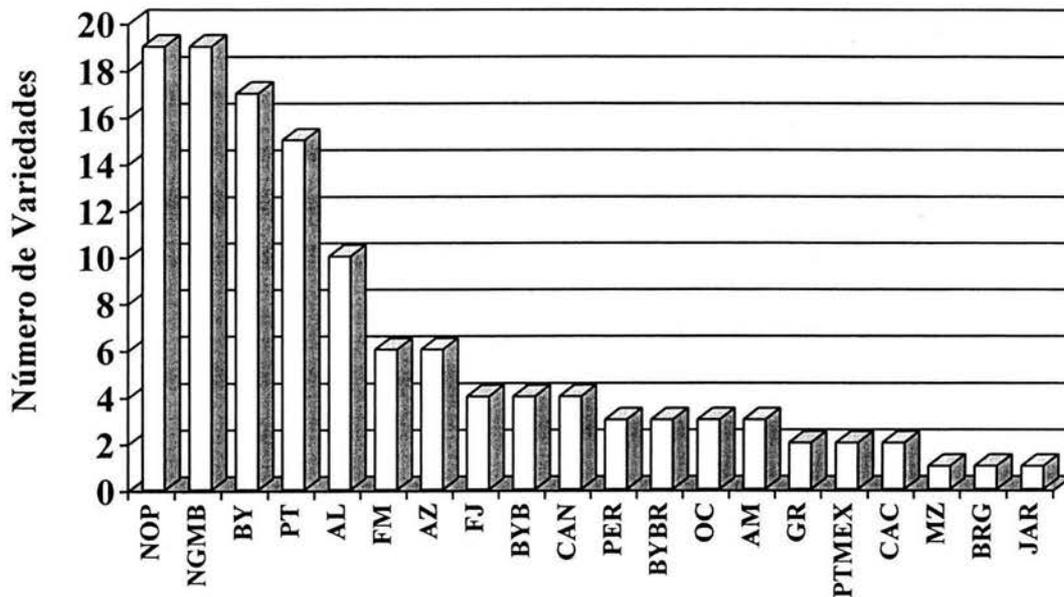


Figura 1. Clases comerciales de grano de frijol y número de variedades mejoradas obtenidas para cada una, por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). INIFAP-CEVAMEX. 1999-2000.

NOP= Negro Opaco Pequeño, NGMB= Negro Brillante Mediano, BY= Bayo, PT= Pinto, AL= Alubia, FM= Flor de Mayo, AZ= Adufrado, FJ= Flor de Junio, BYB= Bayo Blanco, CAN= Canario, PER= Peruano, OC= Ojo de Cabra, AM= Amarillo, GR= Garbancillo, PTM= Pinto Mexicano, CAC= Cacahuete, MZ= Manzano, BRG= Bayo Río Grande y JAR= Jaspeado Rojo.

La mayor cantidad de variedades de tipo negro opaco pequeño y negro brillante mediano es debida, principalmente, a la siembra de este tipo de variedades en prácticamente todas las regiones productoras de frijol en el país. Lo anterior, ha propiciado el alto número de variedades debido a los requerimientos de los productores de contar con variedades adaptadas en sus condiciones de cultivo y, además, por la influencia del mercado en el que estas clases comerciales tienen gran importancia. Otro aspecto muy importante relacionado con el requerimiento de mayor número de variedades es la presión de las enfermedades y otros factores, que muestran variación entre regiones, a los cuales están expuesta estas clases comerciales de grano al sembrarse en diferentes regiones.

Otras clases comerciales cuentan con un reducido número de variedades debido a varios factores entre los que sobresale la dificultad para recuperar el tipo de grano, en cuanto a color, tamaño y forma, después del proceso de mejoramiento por cruzamiento y selección. En este caso se encuentra la clase flor de mayo, azufrado, peruano y flor de junio, por lo que debe dedicarse mayor esfuerzo para generar mayor diversidad genética en este tipo de variedades debido principalmente al riesgo que implica la siembra de pocas variedades en grandes extensiones. Esto con el fin de reducir los riesgos ocasionados por la incidencia recurrente de los problemas de producción como las enfermedades, sequía y otros factores. Existen otras clases comerciales que son consumidas en regiones muy localizadas, por lo que su nivel de consumo y número de variedades es reducido.

Afortunadamente, en nuestro país se conserva la diversidad genética del germoplasma del frijol, debido principalmente a la variación en el gusto de los consumidores que propicia la siembra de diferentes clases comerciales de frijol y a la diversidad de ambientes, lo que hace necesario un mayor número de variedades que se adapten en uno o diversos sistemas de siembra. Esto contrasta con algunas regiones productoras de frijol en el mundo, en las que se siembran pocas variedades comerciales con lo que se incrementan los riesgos de producción. Por lo anterior, se debe considerar el mantenimiento de la variabilidad genética, presente en variedades criollas y mejoradas de frijol, en los bancos de germoplasma. Con lo anterior, es posible conservar e identificar progenitores potenciales para nuevas recombinaciones o cruzamientos y con ello ampliar la base genética dentro de cada una de las clases comerciales de frijol sembradas en México y con ello incrementar y estabilizar los rendimientos obtenidos con esta leguminosa.

El análisis de componentes principales mostró que 14 variables en forma conjunta explicaron el 60 % de la varianza observada. Estas variables, en el componente principal 1 explicaron un 40% del total de la varianza y en el componente principal 2 el 20.4 %. Se observó el agrupamiento, en el cuadrante I de la Figura 2, de las variables ancho de la vaina (evaluada en forma visual y con la ayuda de la regla milimétrica), tamaño del grano (peso de 100 semillas, g), tamaño de la vaina en centímetros y la localización de la inflorescencia. Lo anterior, debido a la influencia existente entre las variables relacionadas con las dimensiones de la vaina, de las cuales depende el tamaño del grano. La localización de la inflorescencia se agrupó con estas variables debido a que la mayoría de las variedades que mostraron la inflorescencia sobre el follaje mostraron también mayores dimensiones de la vaina y mayor tamaño de grano. Tal es el caso de las variedades con hábito de crecimiento determinado y en algunos casos se observó estas combinaciones en variedades de hábito de crecimiento indeterminado.

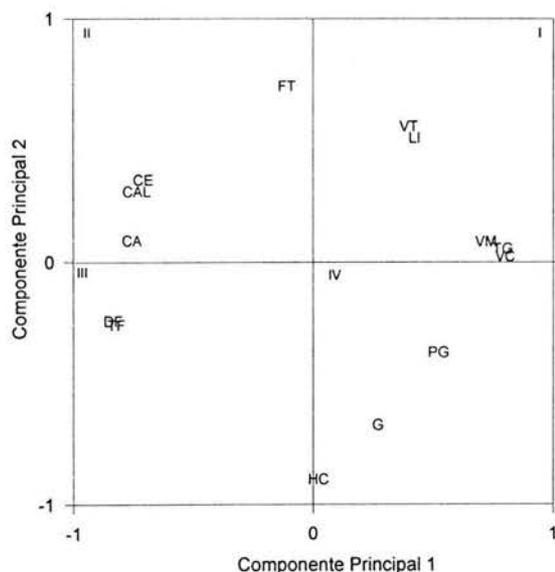


Figura 2. Componentes principales 1 y 2 para 14 variables evaluadas en 120 variedades de frijol. Sta. Lucia de Prías, Estado de México. INIFAP-CEVAMEX. 1999-2000.

DF= Días a Floración, FT= Tamaño del Foliolo Terminal, VT= Tamaño de la Vaina, TF= Tiempo de Floración, VM= Vaina Anchura Media, HC= Hábito de Crecimiento, LI= Localización de la Inflorescencia, CE= Color del Estandarte, CAL= Color de las Alas, TG= Tamaño del Grano (g/100 semillas), CA= Coloración Antocianínica del Hipocotilo, VC= Vaina Anchura Media (cm), PG= Prominencia de los Granos, G= Altura de la Planta con guía.

En el cuadrante II se observó el agrupamiento de las variables color del estandarte, color de las alas y la coloración antocianínica del hipocotilo. Lo anterior, debido a que en general las variedades que mostraron coloración antocianínica, en el estado de plántula, mostraron coloración morada o violeta del estandarte y las alas de la flor; mientras que las variedades que no mostraron coloración en el tallo tuvieron colores claros del estandarte y las alas de la flor. Estas variables se agruparon con el tamaño del foliolo terminal, a pesar de no observarse una relación considerable ($r= 0.2$) entre variables. A pesar de lo anterior, esta característica es de importancia en el estudio de la diversidad genética debido a las variaciones existentes para esta variable observada tanto entre clases comerciales como dentro de ellas (Cárdenas, 1968 y 1984).

En el cuadrante III se observó el agrupamiento de las variables relacionadas con la floración, como fueron: el tiempo de floración evaluado en forma cualitativa y el número de días entre la siembra y la floración, del que se derivó el anterior; esto debido a la relación existente entre estas dos variables para la que se observó una relación positiva y altamente significativa ($r= 0.97^{**}$). Por ello puede decirse que puede utilizarse cualquiera de estas variables para la caracterización de germoplasma de frijol, aunque la más comúnmente utilizada es el número de días entre la siembra y la floración, también conocido como días al inicio de la floración.

Por último, en el cuadrante IV, se agruparon las variables hábito de crecimiento, altura de la planta con guía en centímetros y la prominencia de los granos. Lo anterior, puede deberse a que las variedades que mostraron mayor altura de la planta mostraron en general mayor prominencia de los granos y fueron de hábito de crecimiento indeterminado postrado tipo III. Es evidente, que las variedades con hábito de crecimiento determinado mostraron menor altura de la planta, debido a que no tienen guía y en algunos casos también su altura del dosel fue reducida, por la reducida longitud de los entrenudos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, son similares a los observados en un estudio en el que se evaluó descriptores o características morfológicas en un grupo de 1000 colectas de *P. vulgaris*, en el que algunas de las variables aquí mostradas en combinación con otras permitieron explicar el 83 % de la variabilidad genética observada en ese estudio (Hidalgo, 1991).

El análisis de componentes principales basado en las 14 variables que mostraron mayor peso en la explicación de la varianza observada, en el estudio de las 120 variedades, permitió diferenciar cuatro grupos más o menos definidos Figura 3. En el primer conglomerado se agruparon las variedades de tipo negro opaco pequeño principalmente de la raza Mesoamérica (Singh, 1991b). Este grupo además incluyó un subgrupo de variedades con tipo de grano negro brillante mediano y variedades recombinantes como bayo berrendo que a pesar de tener tipo de grano crema o bayo, el resto de sus características son parecidas con respecto a las variedades de tipo negro. Resultados similares fueron obtenidos por otros investigadores en los que se apreció la separación de este tipo de germoplasma, considerado dentro de la raza Mesoamérica originaria de México (Beebe *et al.*, 2000). Además, dentro de este grupo puede apreciarse una separación entre las variedades de tipo negro opaco pequeño sembradas principalmente en las regiones tropicales de baja altitud y aquellas variedades de tipo negro brillante mediano sembradas en las regiones del Altiplano.

El segundo conglomerado, que mostró mayor diversidad, incluyó las variedades desarrolladas y sembradas principalmente en el Altiplano de México con grano de tipo bayo, pinto, flor de junio, flor de mayo, manzano, garbancillo, bayo blanco, bayo río grande, ojo de cabra, alubia, pinto mexicano, y el tipo azufrado. Lo anterior, debido a la mayor variación ambiental y la diversidad de gustos de los consumidores de frijol, en esa región. En este grupo también pudo observarse un grupo de variedades que son consideradas como recombinantes, ya que se observó el caso de algunas que tienen el tipo de grano bayo blanco o pinto y muestran características observadas principalmente en las variedades de tipo negro (flor morada, coloración antocianínica en el tallo, etc.). A pesar del mayor número de clases comerciales de frijol, se observó una mayor relación entre las variedades de este grupo debido principalmente a la recombinación entre ellos para la conservación de algunas características agronómicas y comerciales, que permiten su aceptación por productores y consumidores, así como su adaptación en el Altiplano de México.

Un tercer grupo incluyó las variedades de la raza Nueva Granada como son los tipos azufrados, peruanos, canarios, cacahuete, algunas del tipo bayo y flor de mayo, en su totalidad con hábito de crecimiento determinado tipo I, desarrolladas para condiciones climáticas favorables (riego). Este agrupamiento fue favorecido por la utilización de

germoplasma de otra raza (Nueva Granada) y acervo genético (Andino) en el mejoramiento de este tipo de variedades, algunas de las cuales son sembradas en la región del Trópico Seco. El cuarto grupo incluyó únicamente la variedad de frijol tipo alubia de ayocote Blanco Tlaxcala, lo cual es fácilmente explicable debido a que pertenece a otra especie (*Phaseolus coccineus*).

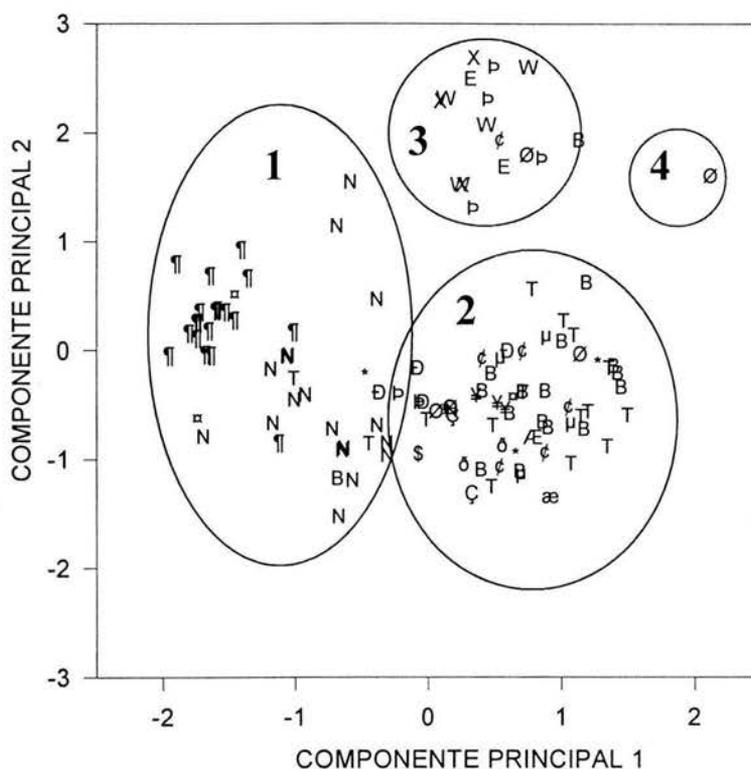


Figura 3. Componentes principales 1 y 2 correspondientes a 14 variables evaluadas en 120 variedades de frijol, de diferente clase comercial de grano. Santa Lucia de Prías Edo. de México. INIFAP-CEVAMEX. 1999-2000.

¶= Negro Opaco Pequeño, N= Negro Brillante Mediano, T= Pinto, □= Bayo Berrendo, B= Bayo, Ø= Alubia, ♡= Amarillo Mostaza, P= Azufrado, X= Peruano, Ð= Bayo Blanco, Ç= Garbancillo, E= Cacahuete, W= Canario, * = Ojo de Cabra, \$= Flor de Abril, ç= Flor de Mayo, µ= Flor de Junio, Æ= Manzano, ð= Pinto Mexicano, æ= Bayo Río Grande.

A pesar de diversidad registrada en el frijol como especie en México, puede observarse que las variedades evaluadas dentro de las diferentes clases comerciales se agrupan en forma más o menos definida, conservando el agrupamiento basado en el concepto de razas genéticas (Singh, 1991b). Entre los grupos diferenciados, puede decirse que se ha observado limitaciones impuestas por la necesidad de obtener el tipo de grano comercial que debe tener cierta coloración, tamaño y forma, con lo que se ha reducido las posibilidades de ampliación de la base genética en las diferentes clases comerciales. A pesar de lo anterior, puede decirse que en las clases de mayor importancia, sembradas principalmente en el Altiplano, el mejoramiento genético ha obtenido avances de consideración en la diversificación del germoplasma mejorado de frijol por lo que se han generado variedades de mayor precocidad, resistencia a las enfermedades, etc. debido principalmente a las variaciones impuestas por el ambiente y los requerimientos del mercado.

En algunas regiones y tipos comerciales se observó menor diversidad genética, favorecida por la utilización de padres donantes comunes adaptados en una región dada los que cuentan con las características que necesariamente deberán tener las nuevas variedades, lo que ha reducido la posibilidad de ampliación de la base genética y el incremento de los riesgos de producción.

La evaluación de las variables días a floración, altura de la planta (considerando la guía), el peso de la semilla, el ancho de la vaina y hábito de crecimiento permitió determinar el grado de variabilidad existente en cada una de las clases comerciales. Para la variable días a floración se observaron los más altos valores en la clase comercial negro opaco pequeño, con un promedio de 57 días, un mínimo de 55 y un máximo de 66 días a la floración (Figura 4). Lo anterior, debido a la mayor longitud del ciclo biológico observado en este tipo de variedades, que han sido desarrolladas y son cultivadas en las regiones tropicales. En estas regiones, las temperaturas son más benéficas; por lo que, las condiciones en las que se realizó el presente estudio (menor temperatura) provocaron retraso de la floración en algunas variedades. Otras clases comerciales que mostraron variabilidad para este carácter fueron la clase tipo negro brillante mediano, pinto y el tipo alubia con mínimos entre 42 y 45 días y máximos entre 60 y 65 días, respectivamente.

Lo anterior, debido principalmente al mayor número de variedades generadas dentro de estas clases comerciales, a la variabilidad existente en este tipo de germoplasma para este carácter y al avance genético observado en estas clases comerciales, principalmente en la región del Altiplano de México en el que se ha logrado importante reducción del número de días a la floración, lo cual se considera como una importante característica para dar mayor estabilidad al rendimiento (Rosales *et al.*, 1998). Para lograrlo, se ha utilizado diferentes fuentes de precocidad y es posible que la distancia genética de los progenitores utilizados en los cruzamientos sea mayor. A pesar de lo anterior, en algunas clases comerciales como el tipo peruano, garbancillo, pinto mexicano y el cacahuate se observó poca diversidad para esta variable debido principalmente al reducido número de variedades y a la similitud genética y fenotípica entre estas.

Para la variable altura de planta, la mayor amplitud de la variación fue observada en la clase comercial negro brillante (Figura 4) con un mínimo de 42 y un máximo de 117 cm. Lo anterior, debido principalmente a que en esta clase comercial se incluyó variedades consideradas dentro de la raza Jalisco que tienen la capacidad de utilizar una alta cantidad de biomasa en la formación de guías y ramas. Situación similar fue observada en las clases comerciales flor de mayo, flor de junio, bayo y pinto, que incluyen entre sus progenitores variedades de esa raza genética.

Esta diversidad es debida principalmente a que en estas clases comerciales se han desarrollado variedades para la región Templada Subhúmeda y Altiplano Semiárido, entre las que hay algunas diferencias en los caracteres seleccionados en cada región, en este caso la altura de planta, ya que algunas variedades de la región central de México fueron desarrolladas para el cultivo en asociación con el maíz. Con base en la altura de planta pudo observarse, poca variabilidad en las clases comerciales peruano, cacahuate, pinto mexicano y garbancillo, en algunos casos debido al reducido número de variedades para cada clase comercial y en otros en la utilización de materiales genéticamente cercanos, para la recuperación del tipo de grano comercial, el tipo de planta y otros atributos necesarios para su adaptación y aceptación por parte de los productores.

La clase comercial que mostró mayor nivel de variación para el peso de la semilla fue la clase comercial alubia en la que esta variable fluctuó desde los 18 a los 94 gramos (Figura 5), esto debido a que en esta clase comercial se incluyó la variedad de frijol ayocote Blanco Tlaxcala (*P. coccineus*) que fue la que mostró el más alto peso de la semilla. Otras clases comerciales que mostraron variabilidad para esta característica fue la clase negro brillante, el tipo pinto, flor de mayo y bayo berrendo; mientras que las clases comerciales canario, peruano, garbancillo, pinto mexicano y cacahuate mostraron reducida diversidad. En el caso de las clases comerciales que mostraron mayor variación esta fue debida al mayor nivel de recombinación entre progenitores para lograr la adaptación a un mayor número de ambientes observados en el Altiplano Semiárido y Región Templada Subhúmeda; así como a la selección de líneas y variedades con clase comercial, sin considerar el tamaño de la semilla como criterio de selección, lo que llevó a que algunas variedades no cumplieran con las expectativas para su adopción por parte de los productores.

Así, en la clase pinto, se observó que la variedad Delicias 71 fue la única que mostró un tamaño de la semilla pequeño (21 g) y el resto de las variedades tuvieron semilla mediana a grande, mientras que en la clase flor de mayo se incluyó a la variedad Flor de Durazno, que presentó grano grande y el resto mostró tamaño de grano mediano.

La variable ancho de la vaina (cm) mostró los mayores niveles de variación en las clases comercial bayo, pinto, alubia y negro brillante (Figura 5) debido principalmente a los niveles de variación observados en forma natural en estas clases comerciales y a la recombinación genética con variedades de otras clases comerciales que muestran variación para esta característica.

En cuanto a la variable hábito de crecimiento la clase comercial que mostró mayor nivel de variabilidad fue la clase negro brillante que tuvo variedades en todos los hábitos de crecimiento (I, II y III). La clase negro opaco pequeño la mayoría de las variedades fueron del tipo indeterminado arbustivo tipo II y solo la variedad Negro 8025 fue del tipo indeterminado postrado tipo III. Con excepción de las clases comerciales de tipo azufrado, peruano, negro opaco, cacahuate y canario, en todas las clases comerciales predominó el hábito de crecimiento indeterminado postrado tipo III con un total de 84 variedades, seguido por el tipo indeterminado arbustivo tipo II con 19 variedades y el determinado arbustivo tipo I con 17.

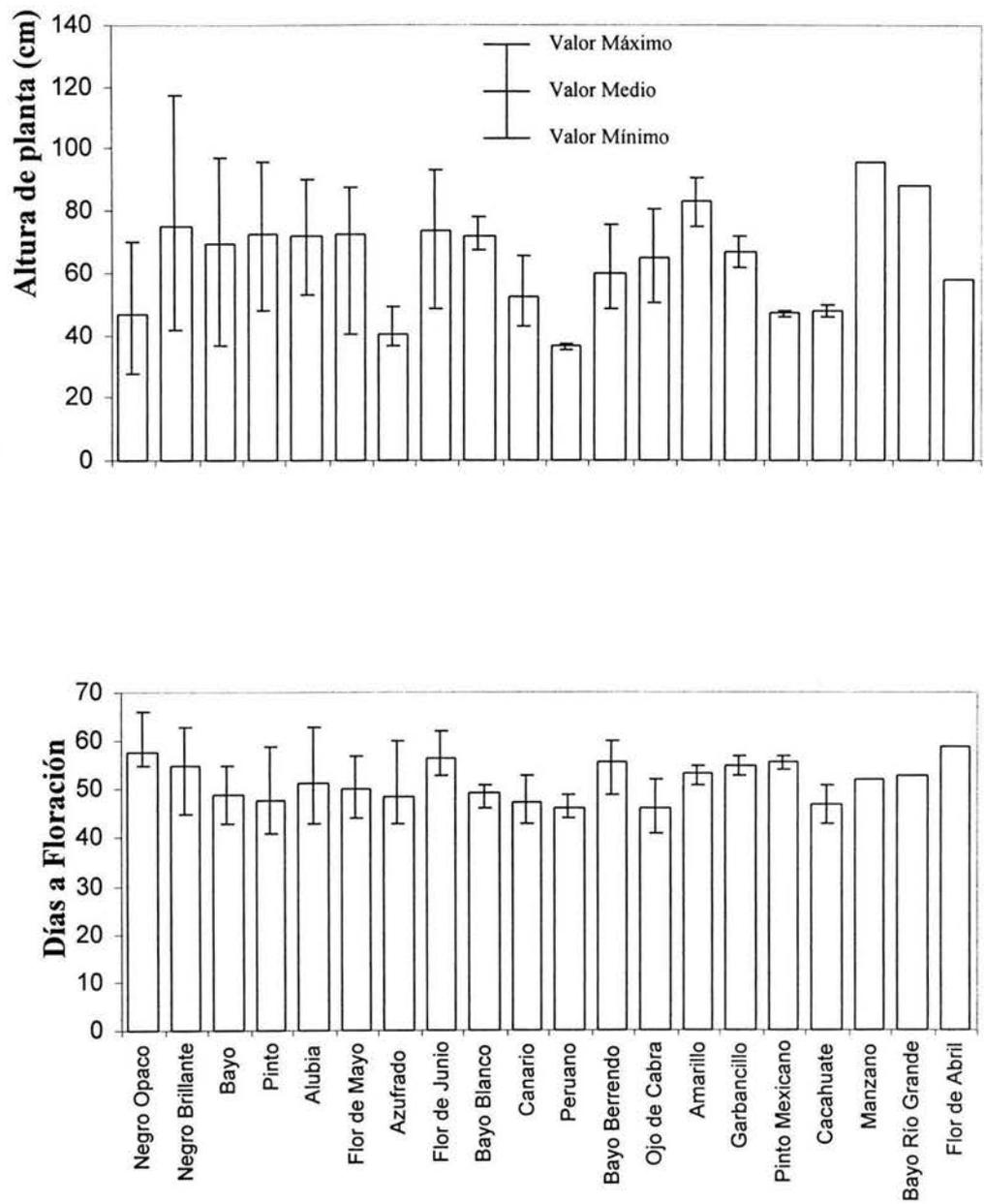


Figura 4. Mínimo, máximo y promedio para el número de días a floración y altura de planta evaluados en 120 variedades de frijol agrupadas por clase comercial. Santa Lucia de Prías, Edo. de México. INIFAP-CEVAMEX. 1999-2000. (Las clases comerciales que no muestran variación es debido a que solo cuentan con una variedad).

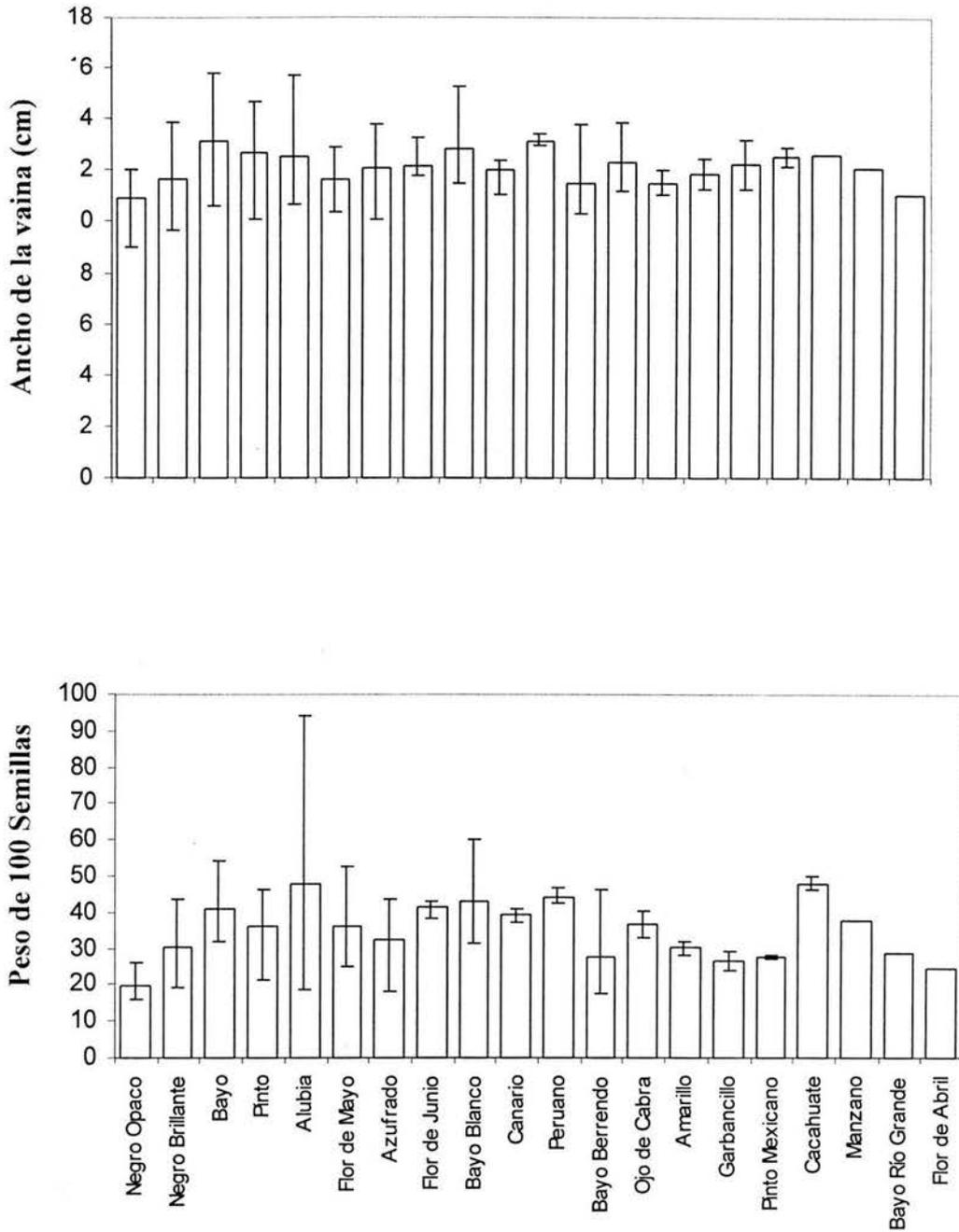


Figura 5. Mínimo, máximo y promedio para el peso de 100 semillas y ancho de la vaina, evaluados en 120 variedades de frijol agrupadas por clase comercial de grano. Santa Lucia de Prías, Edo. de México. INIFAP-CEVAMEX. 1999-2000. (Las clases comerciales que no muestran variación es debido a que solo cuentan con una variedad).

El predominio de las variedades con hábito de crecimiento indeterminado tipo III es debido principalmente a que la principal región productora de frijol en México se encuentra en el Altiplano, en el que este tipo de variedades muestran buena adaptación y son las más populares para su siembra (Rosales *et al.*, 1998). Puede apreciarse que el mejoramiento genético ha avanzado sistemáticamente hacia formas más eficientes de la planta con menor producción de guías y de porte erecto. Con esto se ha ido descartando las formas trepadoras (tipo IV), debido a su ciclo biológico más largo y al crecimiento excesivo. En las regiones del trópico las formas arbustivas determinadas tipo I e indeterminadas tipo II, en combinación con otras características, son las que muestran mejor adaptación y son del agrado de los productores.

Las 59 variables fueron utilizadas para obtener un dendograma en el que se pudiera apreciar en forma gráfica el grado de variabilidad genética existente en el frijol como especie y en cada clase comercial de grano. Así en la Figura 6, puede apreciarse 4 grupos. El primer grupo se divide en dos subgrupos en uno de los cuales se encuentran las variedades con hábito de crecimiento indeterminado arbustivo tipo II con grano del tipo negro opaco pequeño sembrado principalmente en la región del Trópico Húmedo y algunas áreas de la región del Trópico Seco, ya que este tipo de variedades proviene de la raza Mesoamérica.

Otras variedades que incluye este grupo son Negro 8025 y Negro Altiplano con hábito de crecimiento indeterminado postrado tipo III, liberadas en el Altiplano pero provienen de cruzamientos que incluyen progenitores de amplia adaptación, provenientes de germoplasma sembrado en regiones tropicales (raza Mesoamérica). La mayor distancia observada para la variedad Bayo Berrendo que puede considerarse como recombinante, ya que a pesar de tener grano de color crema el resto de sus características corresponden a las variedades de tipo negro. En el otro subgrupo se incluyeron las variedades sembradas principalmente en el Altiplano de México con hábito de crecimiento indeterminado postrado tipo III, aunque también es posible encontrar variedades recombinantes que a pesar de tener tipo de grano bayo (Bayo 161, Bayo Durango y Durango 222) tienen características del material tipo negro (flor morada, coloración morada del tallo, etc.).

Puede apreciarse mayor distancia en las variedades mejoradas liberadas por otras instituciones (N. Precoz, Promisorio 219 y Negro Tardío) debido a la utilización de diferentes caracteres de selección y a la utilización de diferentes fuentes de germoplasma.

El grupo II incluyó a variedades con diferente tipo de grano comercial pertenecientes a las razas Jalisco y Durango debido principalmente a la recombinación genética entre estas razas para obtener variedades adaptadas a las diferentes áreas productoras del Altiplano de México y al intercambio de germoplasma entre los programas de mejoramiento genético de estas regiones.

El agrupamiento mostró la sensibilidad para detectar la similitud entre las variedades emparentadas como es el caso de Bayo 400 y Ojo de Cabra 400 derivadas del mismo cruzamiento (C14-46-2-2-2/Bayo 107). Este fue el grupo de mayor nivel de diversidad debido principalmente al cruzamiento interracial y a la introducción de germoplasma de otros programas de mejoramiento genético internacionales (Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT; Universidad Estatal de Michigan, MSU, etc.).

El tercer grupo casi igualmente diverso incluyó variedades en su mayoría de color amarillo de los tipos bayo, canario, azufrados, etc. Además, se aprecian las variedades de grano de color blanco (alubia) de las cuales la más distantes genéticamente fue la variedad Blanco Tlaxcala (*Phaseolus coccineus*). Es importante considerar la formación de varios subgrupos: el primero formado por las variedades de tipo azufrado y peruano, los que son de hábito de crecimiento determinado tipo I y pertenecen a la raza Nueva Granada otras variedades incluidas en este subgrupo son las variedades de tipo canario entre los que se observa poca variabilidad la cual es acrecentada por la variedad Bayomex que es el resultado de la recombinación de germoplasma de diferente raza genética.

El grupo que mostró altos niveles de variabilidad genética fue el formado por tres variedades de hábito de crecimiento determinado tipo I y dos de ellas de tipo Cacahuate (crema moteado de rojo) que son Cacahuate 72 y Rayado Rojo. Además, este grupo incluyó la variedad con grano tipo Flor de Mayo llamada Flor de Durazno generada por retrocruzamiento, del que la variedad Cacahuate 72 es el progenitor recurrente. Como puede observarse este tipo de variedades tienden a agruparse en forma separada del resto de las variedades debido tal vez a que fueron generadas mediante el uso de germoplasma de otra raza genética (Nueva Granada), y presenta diferentes características morfológicas.

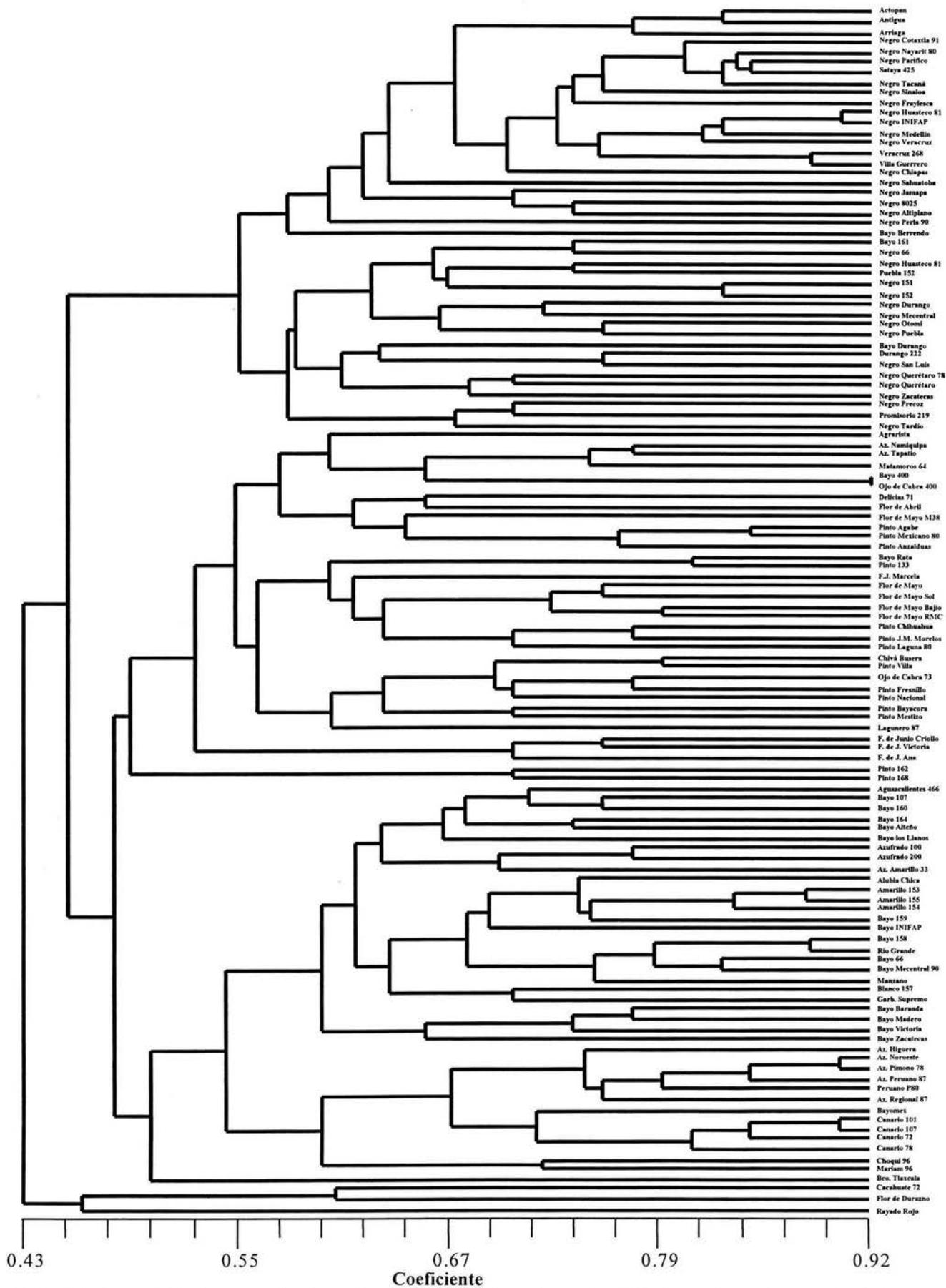


Figura 6. Coeficiente de similitud, para variedades mejoradas de frijol, observado en el análisis de conglomerados por el método UPGMA obtenido con base en 59 variables evaluadas durante dos años en Santa Lucia de Pías, Edo. de México. INIFAP-CEVAMEX. 1999-2000.

4.2. Caracterización Con Marcadores Genéticos Moleculares

De los 7 iniciadores evaluados (OPERON Technologies) se seleccionaron solo 5, los que originaron mayor número de bandas amplificadas y mejor definidas (Cuadro 4). Para el análisis mediante ISSRs, se consideraron como bandas polimórficas aquellas que están ausentes al menos en uno de los materiales evaluados; de tal forma que, aunque una banda estuviera presente en la mayoría de los materiales, si falta en solo uno, es considerado polimórfica y de lo contrario se consideró como monomórfica. Se obtuvieron 68 bandas, en su mayoría polimórficas (82%). Los iniciadores que mayor número de bandas generaron fueron (CA)8RT (19 bandas), DBDA(CA)7 (19 bandas) y (AC)8YG (17 bandas), con un porcentaje de polimorfismo de 95%, 68% y 94%, respectivamente. Este nivel de polimorfismo nos puede dar una estimación de la variabilidad genética existente entre las variedades evaluadas. Las fotografías (Anexo 7.5.A), nos muestran los geles, cada uno con 95 variedades, en los que se observa como cambia el patrón de bandeo de cada una. Ésta es una forma sencilla de distinguir e identificar la variabilidad existente entre variedades, y así obtener una matriz binaria y el polimorfismo.

Cuadro 5. Nivel de polimorfismo obtenido con cinco iniciadores ISSRs, en variedades mejoradas de frijol. INIFAP-CEVAMEX. 2001.

No. Iniciador ¹	No. total de bandas	Bandas polimórficas	Polimorfismo %
1 (CA)8RT	19	18	95
2 DBDA(CA)7	19	13	68
3 (AC)8YG	17	16	94
4 (GA)8YC	8	6	65
5 (TCC)5RY	5	3	60

¹ R ancla residuos de Purina, Y para Pirimidina, B para cualquiera menos Adenina, D para cualquiera menos citosina, A: Adenina, T: Timina, C: Citosina y G: Guanina.

Una vez analizada la matriz binaria, de ceros y unos, generada a partir de los datos moleculares de las bandas ISSRs, se obtuvo una matriz de distancias genéticas. Las distancias se encuentran entre valores de 0 y 1; valores cercanos a 1 significan que son materiales muy emparentados genéticamente; mientras que valores cercanos a cero, se refieren a materiales poco emparentados.

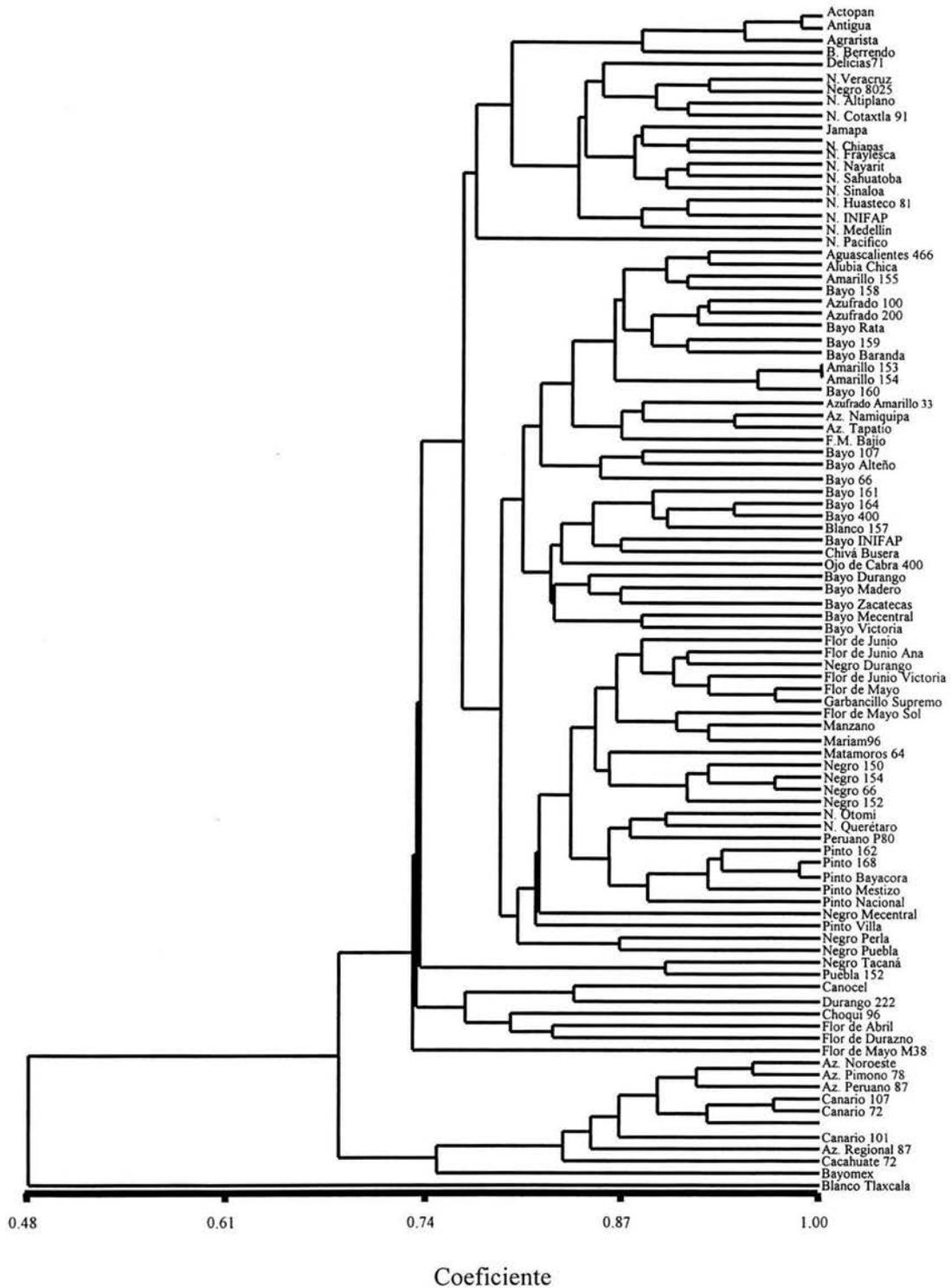


Figura 7. Coeficiente de similitud, para variedades mejoradas de frijol, observado en el análisis de conglomerados por el método UPGMA obtenido con base en ISSRs. INIFAP-CEVAMEX. 2000-2001.

De la matriz de distancias genéticas se derivó el dendograma mostrado en la Figura 7, en el cual se agruparon los diferentes materiales de frijol. La utilización de marcadores genéticos moleculares mostró una conformación similar a la observada en el agrupamiento obtenido con características morfológicas aunque, en algunos casos, se acentuaron algunas de las diferencias entre y dentro de los grupos.

El grupo I estuvo formado por las variedades de grano negro opaco pequeño, en el que fue posible observar variedades muy cercanas genéticamente como lo son Actopan y Antigua, que tienen como progenitor común una variedad criolla de la Huasteca Hidalguense. Dentro de este grupo la variedad genéticamente más distante fue Negro Pacífico, la cual fue generada con germoplasma de diferentes razas y acervos genéticos y uno de sus progenitores Sataya 425, fue generado por una crusa doble (Ver-1-A-6/P. Marrow//Jamapa/Canario 101) entre material de la raza Mesoamérica y Nueva Granada. Como puede apreciarse la diversificación de las fuentes de germoplasma, relacionada con la utilización de progenitores genéticamente distantes, puede contribuir al incremento de la variabilidad genética dentro de las diferentes clases comerciales de frijol sembradas en México.

En el segundo grupo pueden observarse dos subgrupos, el primero agrupa variedades con diferentes tonalidades del amarillo como los tipos Bayos, sembrados principalmente en el Altiplano de México. En este análisis se corroboró la similitud genética entre las variedades Amarillo 153 y Amarillo 154, las cuales son sembradas en el estado de Puebla la primera y entre este mismo estado y el estado de México la segunda. Esta similitud había sido observada con base en la caracterización realizada con los atributos morfo-agronómicos.

Otras variedades que habían sido consideradas como idénticas, con el uso de los caracteres morfo-agronómicos, mostraron mayor distancia genética con base en los marcadores genéticos moleculares; tal es el caso de las variedades Ojo de Cabra 400 y Bayo 400. Otras variedades recombinantes, con base en la caracterización en campo (Bayo Durango), se agrupan con variedades que tienen progenitores comunes y/o de la misma región como lo son: Bayo Madero o Bayo Zacatecas. Lo anterior, muestra los posibles errores en los que se puede incurrir cuando la clasificación se realiza con base en los caracteres morfológicos. Además, es posible observar variedades que aparentemente no están relacionadas, tal es el caso de la variedad Bayo INIFAP y Chivá Busera, la primera variedad mejorada con grano

tipo garbancillo y variedad criolla con grano tipo ojo de cabra la segunda; sin embargo, al observar la genealogía puede observarse que Bayo INIFAP cuenta entre sus ancestros las variedades mexicanas Jamapa (Mesoamérica), Guanajuato 31 y una variedad con tipo Ojo de Cabra como lo es la variedad Carioca, lo que explica en parte los resultados obtenidos.

Puede observarse un subgrupo formado por las variedades con diferente color de grano, en el que a pesar de la diversidad de colores y de tipos de grano, al analizar la información genealógica, puede decirse que estas variedades tienen ancestros comunes y/o de la misma región geográfica. Además, se observaron algunas recombinaciones obtenidas con germoplasma introducido. Las variedades que mostraron mayor distancia genética fueron Pinto Villa, la cual fue resultado de la recombinación entre diferentes acervos y razas genéticas; la misma situación fue registrada para Negro Perla y Negro Puebla. Esta última fue resultado de la colecta de germoplasma criollo del estado de Puebla.

Otras ramificaciones o subgrupos están dados por los recombinantes naturales como Puebla 152, que muestra características intermedias entre el germoplasma Mesoamericano y del Altiplano. Situación similar se observó con la variedad Negro Tacaná que tiene entre sus ancestros variedades del Trópico Húmedo y germoplasma del Altiplano de México (Negro 150). La variedad Canocel y Durango 222 mostraron similitud genética y al analizar su genealogía puede verse que Durango 222 y uno de los progenitores de Canocel Negro 152 (Zac-4-A-2), pertenecen a la raza Durango y provienen de la misma área ecológica. Situación similar puede observarse en otras variedades como Flor de Abril y Flor de Durazno, que fueron generadas con progenitores cuyos ancestros provienen del estado de Michoacán.

Una de las variedades que mostraron mayor distancia genética, en este grupo, fue la variedad Flor de Mayo M38 que fue generada a partir de la recombinación entre progenitores de diferentes regiones y acervos genéticos. En la genealogía de esta variedad se incluye padres del Altiplano de México (Puebla 152, Tlanlepanla 64, Flor de Mayo) y del Trópico Húmedo (Jamapa), además variedades de la raza Nueva Granada y Mesoamérica. Lo anterior, favoreció la ampliación de la base genética y su resistencia a las enfermedades.

Un cuarto grupo involucró las variedades de hábito de crecimiento determinado, los que tienen clases comerciales azufrado y canario. Este grupo mostró reducida variabilidad genética debido a la utilización recurrente de progenitores como Canario 101 y Canario 107, en combinación con Azufrado 200 y Azufrado 100, para conservar el hábito de crecimiento determinado arbustivo tipo I y facilitar la conservación del color de grano comercial. Otra variedad incluida en este grupo fue Cacahuate 72 con similar hábito de crecimiento, pero derivada de cruzamiento entre variedades genéticamente más distantes.

La variedad más distante de este grupo fue Bayomex, la que se derivó del retrocruzamiento de la variedad Canario 101 y una variedad criolla de Puebla, lo que involucra variedades de diferente raza genética.

Por último, se confirmó que la variedad de frijol ayocote Blanco Tlaxcala difirió del resto de las variedades, debido principalmente a que pertenece la especie *Phaseolus coccineus*.

Como puede apreciarse, si se quiere ampliar la base genética, dentro de las diferentes clases comerciales de frijol, es necesario la diversificación de los progenitores utilizados en la recombinación para generar poblaciones segregantes de las que puedan extraerse variedades de amplia base genética.

V. CONCLUSIONES

- Se observó mayor variabilidad genética entre las variedades mejoradas del Altiplano de México, por la mayor diversidad entre los progenitores utilizados.
- El avance genético más considerable, en las diferentes clases comerciales, se observa para ciertos caracteres como: la reducción en el número de días a floración y madurez, resistencia a las enfermedades, etc.; lo que ha favorecido el incremento y estabilización del rendimiento obtenido con frijol.
- Los diferentes métodos evaluados, permitieron determinar la variabilidad genética presente en las variedades mejoradas de frijol obtenidas en México, aunque se observó mayor precisión para el caso de ISSRs.
- En México la introducción de germoplasma, de centros internacionales, ha permitido el mejoramiento genético y la ampliación de la base genética del frijol como especie.

IZT.



U.N.A.M. CAMPUS

VI. LITERATURA CITADA

- Acosta, G.J.A. y R. Rosales S. 1997. Tecnología de producción de frijol para el estado de México. Desplegable para productores No. 1. CEVAMEX-INIFAP. 2p.
- Acosta, G.J.A., T.S. Herrera F., B. Aguilar G., and P. Gepts. 1999. Seed yield of segregating populations of cultivated x wild *Phaseolus vulgaris*. Ann. Rep. of the Bean Improv. Coop. 42: 93-94.
- Acosta, G.J.A., R. Rosales S., R. Navarrete M. y E. López S. 2000. Desarrollo de variedades mejoradas de frijol para condiciones de riego y temporal en México. Agric. Téc. en México 26: 79-98.
- Ahnert, D., M. Lee, D.F. Austin, C. Livini, W.L. Woodman, S.J. Openshaw, J.S.C. Smith, K. Porter, and G. Dalton. 1996. Genetic diversity among elite sorghum inbred lines assessed with DNA markers and pedigree information. Crop Sci. 36: 1385-1392.
- Akkaya, S.M., R. C. Shoemaker, J.E. Specht., A. A. Bhagwat, and P. B. Cregan. 1995. Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. Crop Sci. 35: 1439-1445.
- Albani, M.C. and M.J. Wilkinson. 1998. Inter Simple Sequence repeat polimerase chain reaction for the detection of somaclonal variation. Plant Breeding 117: 573-575.
- Ammiraju, J.S.S., B.B. Dholakia, D.K. Santra, H. Singh, M.D. Lagu, S.A. Tamhankar, H.S. Dhaliwal, V.S. Rao, V.S. Gupta and P.K. Ranjekar. 2001. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) marker associated with seed size in wheat. Theoretical and Applied Genetics 102: 726-732.
- Avendaño, A.C.H. 2001. Diversidad fenotípica e izoenzimática en cultivares nativos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) tipo negro. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. México. 146p.
- Beebe, S., P.W. Skroch, J. Thome., M.C. Duque., F. Pedraza, and J. Nienhuis. 2000. Structure of genetic diversity among common bean landraces of middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. Crop Sci. 40: 264-273.
- Blair, M. W., O. Panaud and S. R. McCouch. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics 98: 780-792.

- Cárdenas, R.F.A. 1968. Leguminosas de grano. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, S.A.G. Reimpresión de la Memoria del Tercer Congreso Nacional de Fitogenética (1er. Simposio) Sociedad Mexicana de Fitogenética A.C. CENEINEA, Chapingo, México. pp. 340-381.
- Cárdenas, R.F.A. 1984. Clasificación preliminar de los frijoles en México. Folleto Técnico No. 81. INIFAP-SARH. 59p.
- Cárdenas, R.F.A. 2000. Investigación agrícola sobre frijol en México durante el periodo 1943 a 1980. *Agric. Téc. en México* 26: 63-78.
- Castagna, R., G. Maga, M. Perenzin, M. Jun, and F. Salamini. 1994. RFLP-based genetic relationships of Eikorn wheats. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 818-823.
- Castellanos, J.Z., H. Guzmán M., A. Jiménez, C. Mejía, J. de J. Muñoz R., J.A. Acosta G., G. Hoyos, E. López S., D. González E., R. Salinas P., J. González A., J.A. Muñoz V., P. Fernández H., y B. Cázarez. 1997. Hábitos preferenciales de los consumidores de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en México. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 47: 163-167.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical, (CIAT). 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. *In*: van Shoonhoven A. y M.A. Pastor-Corrales (comps.). Cali, Colombia. 87p.
- Cooke, R.J. 1998. The use of molecular markers for variety and seed testing: A summary of research at NIAB. UPOV. Geneva. pp. 2-7.
- Dean, R.E., J.A. Dahlberg, M.S. Hopkins, S.E. Mitchell, and S. Kresovich. 1999. Genetic redundancy and diversity among 'Orange' accessions in the U.S. National Sorghum Collection as assessed with Simple Sequence Repeat (SSR) markers. *Crop Sci.* 39: 1215-1221.
- García, E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köpen. Offset Larios. México. 217 p.
- Gepts, P., and D. Debouck. 1991. Origin, Domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *In*: van Schoonhoven, A. and Voysest O. (eds). Common Beans: Research for Crop Improvement. CAB International and CIAT. Reedwood Press Ltd., Melksham, Wiltshire. U.K. pp.7-53.

- Guillén, A.H., L. Montalvo H., V. Montero T., O.A. Medero S. y J.A. Acosta G. 2000. Etiquetado del gen de la respuesta al fotoperiodo en frijol común mediante ISSRs y RAPDs. Memoria del XVIII Congreso de Nacional Fitogenética. SOMEFI. Chapingo, México. p.308.
- Hidalgo, R. 1991. CIAT'S world *Phaseolus* collection. *In*: van Schoonhoven, A. and O. Voysest (eds.). Common Beans: Research for Crop Improvement. CAB International and CIAT. Reedwood Press Ltd., Melksham, Wiltshire. U.K. pp.163-197.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 1988. Abasto y comercialización de productos básicos: Frijol. p.63.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, (INIFAP). 1998. Situación actual y conversión productiva frijol (*P. vulgaris*). Folleto de Circulación Interna. Dirección General de la División Agrícola. p.22.
- Khush, G.S. and T. Kinoshita. 1991. Rice karyotype, marker genes, and linkage groups. *In*: Khush, G. S. and G. H, Toenniessen. (eds.). Rice Biotechnology. CAB International-IRRI. Manila, Filipinas. pp. 83-108.
- Kojima, T., T. Nagaoka, K. Noda, and Y. Ogihara. 1998. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 37-45.
- Kelly, J.D. 1998. Experience with plant variety protection in the united states. *Michigan Dry Bean Digest* 22(4): 2-9.
- Lepiz, I.R., y F.J. Navarro S. 1983. Frijol en el noroeste de México (Tecnología de producción). *Campo Agrícola Experimental Valle de Culiacán*. INIA. 218 p.
- Lübberstedt, T., A. E. Melchinger, C. Dußle, M. Vuylsteke, and M. Kuiper. 2000. Relationships among early european maize inbreds: IV. Genetic diversity revealed with AFLP markers and comparison with RFLP, RAPD and pedigree data. *Crop Sci.* 40: 783-791.
- Martínez, M.A. 1998. Caracterización morfológica y agronómica de 20 genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en Chapingo México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. p. 92.

- Metais, I., C. Aubry, B. Hamon, R. Jalouzot and D. Peltier. 2000. Description and analysis of genetic diversity between commercial bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 101: 1207-1214.
- Miranda, C. S. 1967. Origen de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común). Reimpresión de Agrociencia. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 1(2): 99-109.
- Miravete, R. 1945. Clasificación del frijol en México. Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Agricultura. Chapingo, Edo. de México. México. pp. 15-25.
- MSTAT-C. 1993. Microcomputer statistical program. Michigan State University. East Lansing. USA.
- Nagaoka, T. and Y. Ogihara. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 597-602.
- Ortiz, V.M. 1998. El Frijol en el estado de Zacatecas. Impresora el Aguila. Zacatecas, México. 181 p.
- Prevost, A. and M.J. Wilkinson. 1999. A New system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 107-112.
- Quian, W., S. Ge, and D.-Y. Hong. 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza garanalata* from china detected by RAPD and ISSR markers. *Theoretical and applied Genetics* 102: 440-449.
- Ramakrishna, W., K.V. Chowdari, M.D. Lagu, V.S. Gupta. and K. Welsing. 1995. DNA fingerprinting to detect genetic variation in rice using hypervariable DNA sequences. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 1000-1006.
- Reyes, M. C. and O. Paredes L. 1993. Hard-to-cook phenomenon in commons beans. A review. *CRC. Crit. Rev. in Food Sci. and Nutr.* 33: 227-286.
- Rohlf, J.F. 1993. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system (Ver. 2.02i). Exeter Publisher Ptd. Setauket, New York. USA.
- Rosales, S.R., R. Ochoa M., y J. A. Acosta G. 1998. Fenología y adaptación del frijol en el altiplano de México. *Memorias del XVII Congreso de la Sociedad Mexicana de Fitogenética. SOMEFI. México.* p.165.

- Rosales, S. R., R. P. Durán D., P. Pérez H., H. Guillén A., J.S. Muruaga M., and J. A. Acosta G. 2001. Patterns of genetic diversity in improved dry bean germplasm from Mexico. *Ann. Rep. of the Bean Improv. Coop.* 44: 21-22.
- Sahagún, C. J. 1997. Uso de los marcadores moleculares en el mejoramiento genético vegetal. Publicaciones del Programa Nacional de Etnobotánica. Serie: Fitodomesticación. No. 6. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 11p.
- Saghai-Marooif, M.A., Soliman, R.A. Jorgensen. and R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *P.N.A.S.* 81: 8014-8018.
- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). 1987. Listado de variedades liberadas por el INIA 1942-1985. Publicación Especial No. 122. INIFAP. 71p.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR). 1997. Anuario estadístico de la producción agrícola de los estados Unidos Mexicanos. Centro de Estadística Agropecuaria. pp. 284-289.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR). 1998. Catálogo de Variedades Vegetales Factibles de Certificación (CVC). Variedades INIFAP. Documento de Circulación Interna. 15p.
- Senior, M.L., E.C.L. Chin, M. Lee, J.S.C. Smith, and C.W. Stuber. 1996. Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the GENE BANK database: Map construction. *Crop Sci.* 36: 1676-1683.
- Shellie-Dessert, K.C., F. A. Bliss. 1991. Genetic improvement of food quality factors. *In:* van Schoonhoven, A. and O. Voysest (eds.). *Common Beans: Research for Crop Improvement.* CAB International and CIAT. Reedwood Press Ltd. Melksham, Wiltshire, U.K. pp.649-677.
- Singh, S.P. 1985. Conceptos básicos para el mejoramiento del frijol por hibridación. *In:* M. López., F. Fernández y A. van Schoonhoven (eds.). *Frijol: Investigación y producción.* Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. p. 109.

- Singh, S.P., J.A. Gutiérrez, A. Molina, C. Urrea. and P. Gepts. 1991a. Genetic diversity in cultivated common bean: II. Marker-based analysis of morphological and agronomic traits. *Crop Sci.* 31: 23-29.
- Singh, S.P., P. Gepts, and D. G. Debouck. 1991b. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany* 45: 379-396.
- Singh, S.P., R. Nodari, and P. Gepts. 1991c. Genetic diversity in cultivated common bean: I. Allozymes. *Crop Sci.* 31: 19-23.
- Smith, J.S.C., S. Kresovich, M.S. Hopkins, S.E. Mitchell, R.E. Dean, W.L. Woodman, M. Lee, and K. Porter. 2000. Genetic diversity among elite sorghum inbred lines assessed with simple sequence repeats. *Crop Sci.* 40: 226-232.
- Union Internationale Pour la Protection des Obtentions Vegetales (UPOV). 1994. Principes directeurs pour la conduite del l'examen des caracteres distinctifs, de l'homogeneite et de la stabilite. Haricot (*Phaseolus vulgaris* L.). Geneve. 42p.
- Union Internationale Pour la Protection des Obtentions Vegetales (UPOV). 1997. Similarity, clustering and dendograms. Geneve. p.2.
- Valadéz, M. E. y G. Kahl. 1997. Análisis del genoma vegetal: Amplificación de las huellas del ADN. *In: Apuntes del Tercer Curso Internacional de Biotecnología Aplicada al Mejoramiento Genético Vegetal. Modulo I.* Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 121p.
- Voyses, V. O. 2000. Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): legado de variedades de América Latina 1930-1999. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 195p.
- Yang, W.A., A.C. de Oliveira, I. Godwin, K. Schertz, and J.L. Bennetzen. 1996. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. *Crop Sci.* 36: 1669-1676

VII. APENDICE

7.1A. Protocolo de Extracción y Aislamiento del Ácido Desoxiribonucleico (ADN)

El procedimiento de extracción y aislamiento de ADN genómico en plantas, realizado en el laboratorio, se basó en el método utilizado por otros investigadores (Saghai-Marroof *et al.*, 1984).

Se utilizó tejido foliar liofilizado, lo más sano y joven posible, el que se guardó en mallas de fibra de vidrio perfectamente etiquetadas y se siguieron las siguientes instrucciones:

1. Pesar de 300 a 400 mg de tejido liofilizado y molido, que se colocan en un tubo de polipropileno de 15 ml para centrifugación.
2. Agregar 9 ml de buffer de extracción, calentado a 65 °C, a los 300-400 mg de tejido vegetal liofilizado y molido. Mezclar invirtiendo el tubo varias veces con suavidad.
3. Incubar durante 60 a 90 minutos en un horno a 65 °C, agitando los tubos continuamente con suavidad.
4. Retirar los tubos del horno, esperar de 4 a 5 minutos para que se enfríen y agregarles 4.5 ml de cloroformo/octanol (24:1). Agitar los tubos durante 5 a 10 minutos para mezclar.
5. Centrifugar a 3,000 revoluciones por minuto (rpm); a temperatura ambiente, durante 10 min.
6. Verter la capa acuosa superior en otros tubos de 15 ml. Agregar 4.5 ml de cloroformo/octanol y agitar suavemente durante 5-10 min.
7. Centrifugar a 3,000 rpm durante 10 min., a temperatura ambiente.
8. Con una pipeta, trasladar la capa acuosa superior en otros tubos de 15 ml que contengan 25-50 µl de 10 mg/ml de Rnasa A (hervida previamente). Mezclar, invirtiendo con suavidad los tubos e incubar durante 30 min. a temperatura ambiente.
9. Agregar 6.0 ml de Isopropanol (2-propanol). Mezclar, invirtiendo con suavidad los tubos.
10. Retirar el ADN precipitado con un gancho de vidrio.
11. Colocar el gancho con ADN en un tubo ependorff que contenga 250 µl de (TE).

7.2A. Instructivo Para la Preparación de las Soluciones y Reactivos Utilizados en el Proceso de Extracción del ADN

1. Cantidad y volumen de cada componente en la mezcla de la solución amortiguadora con CTAB para extracción.

Cuadro 1A. Solución amortiguadora con CTAB para extracción.

Solución	Concentración final	En 100 ml
DH ₂ O		65 ml
1 M Tris – 7.5	100 mM	10 ml
5 M NaCl	700 mM	14 ml
0.5 M EDTA - 8.0	50 mM	10 ml
CTAB	1%	1.0 g
14 M BME	140 mM	1.0 ml

2. TE (Tris EDTA, amortiguador)

- 300 µl de Tris-HCl 1 M pH 7.5 a 90 ml de ddH₂O, aforar a 100 ml.
- 40 µl de EDTA 0.5 M pH 8.0

7.3A. Protocolo de la Electroforesis

1. Cerciorarse que el equipo a utilizar este completo y limpio.
2. Sellar los extremos del portageles con cinta adhesiva, insertar el peine adecuado y colocarlo en una superficie plana o mesa con un nivel portátil.
3. Pesar 8 gramos de agarosa, aforar a 400 ml con TBE 1X y derretirla completamente en un horno de microondas; el gel quedará al 2% recomendado.

4. Enfriar la mezcla hasta 60 °C aproximadamente y vaciarla con cuidado al portageles, remover las burbujas con una punta de micropipeta.
5. En 20 minutos el gel se solidificará, entonces remover el peine y la cinta, y sumergirlo dentro de la cámara de electroforesis con TAE 1X hasta ser cubierto completamente.
6. Colocar las muestras de ADN amplificadas con cuidado en cada pozo del gel, junto con el amortiguador de carga.
7. Incluir un pozo con marcador de peso molecular, para monitorear que la amplificación se realice sin errores.
8. Tapar la cámara de electroforesis y conectar los electrodos a la fuente de poder. La terminal del cátodo azul o negro es de donde partirá la migración de los fragmentos de ADN.
9. Encender la fuente de poder y programarla a 100 voltios máximo, durante 1.5 a 2 horas.
10. Remover el gel del aparato de electroforesis y sumergirlo en una solución de bromuro de etidio durante 15 minutos o un poco más, según las veces que se haya utilizado con anterioridad la solución, agitando suavemente.
11. Observar el gel en el transiluminador de luz ultra violeta durante corto tiempo de exposición y de acuerdo a los resultados obtenidos se decide si se toman fotos.

Se deben tomar las medidas de protección indicadas al contacto con las sustancias químicas utilizadas y los rayos ultra violeta.

Cuadro 2A. Algunas de las características evaluadas en variedades mejoradas de frijol liberadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y otras instituciones. INIFAP-CEVAMEX. 1999-2000.

Característica	Categorías
1. Coloración antocianínica del hipocótilo	Las antocianinas son sustancias que se encuentran en la savia de las plantas, flores y tallos que dan una coloración rojo a violeta. Las opciones utilizadas fueron 1) Ausente y 2) Presente
2. Hábito de crecimiento	Se efectuó con base a lo propuesto por el CIAT (1987). I) Determinado arbustivo II) Indeterminado arbustivo III) Indeterminado postrado IV) Indeterminado con guías trepadoras
3. Altura de la planta	1) Baja, 2) Media y 3) Alta
4. Inicio de crecimiento de las guías	1) Temprano, 2) Medio y 3) Tardío
5. Velocidad de crecimiento de las guías	1) Lenta, 2) Media y 3) Rápida
6. Color de la hoja	1) Verde muy claro, 2) Verde claro, 3) Verde medio, 4) Verde oscuro y 5) Verde muy oscuro
7. Rugosidad de la hoja	1) Ligera, 2) Media y 3) Fuerte
8. Tamaño del foliolo terminal	1) Pequeño, 2) Mediano y 3) Grande
9. Forma del foliolo terminal	1) Triangular, 2) Romboidal y 3) Redondeada
10. Tipo del ápice del foliolo terminal	1) Acuminado corto, 2) Acuminado medio y 3) Acuminado largo. Acuminado= que termina en punta
11. Tiempo de floración	Cuando el 50% de las plantas presentan al menos una flor. 1) Muy precoz, 2) Precoz, 3) Media, 4) Tardía y 5) Muy tardía
12. Localización de las inflorescencias en la planta	1) En el follaje, 2) Parcialmente en el follaje y 3) Sobre el follaje
13. Tamaño de las brácteas en la flor	1) Pequeña, 2) Mediana y 3) Grande
14. Color del estandarte en la flor	1) Blanco, 2) Rosa y 3) Violeta
15. Color de las alas en la flor	1) Blancas, 2) Rosas y 3) Violetas
16. Color de grano en llenado de vainas, solamente en variedades de semilla blanca	1) Blanco y 2) Verde claro
17. Longitud de las vainas	1) Muy corta, 2) Corta, 3) Mediana, 4) Larga y 5) Muy larga
18. Anchura de la vaina	1) Angosta, 2) Media y 3) Ancha
19. Sección transversal de la vaina	1) Elíptica estrecha, 2) Elíptica, 3) Elíptica ancha, 4) Acorazonada, 5) Circular y 6) En forma de ocho
20. Color de la superficie de la vaina	1) Amarillo, 2) Verde y 3) Violeta
21. Intensidad del color de la superficie	1) Clara, 2) Media y 3) Oscura
22. Pigmentación de la vaina	1) Ausente y 2) Presente
23. Color de la pigmentación	1) Roja y 2) Violeta
24. Moteado del pigmento	1) Esparcido, 2) Medio y 3) Denso
25. Hebras en la vaina	1) Ausente y 2) Presente
26. Grado de la curvatura de la vaina	1) Ausente o muy ligera, 2) Ligera, 3) Media, 4) Fuerte y 5) Muy fuerte
27. Forma de la curvatura	1) Hacia la parte ventral, 2) Forma de S y 3) Hacia la parte dorsal

Cuadro 2A. Continuación...

Característica	Categorías
28. Forma de la punta en la vaina	1) Puntiguda y 2) Roma (obtusa)
29. Apergaminado en la vaina (llenado de grano)	1) Ausente y 2) Presente
30. Longitud del pico	1) Corto, 2) Medio y 3) Largo
31. Curvatura del pico	1) Ausente o muy ligera, 2) Ligera, 3) Media, 4) Fuerte y 5) Muy fuerte
32. Prominencia de los granos en la vaina	1) Débil, 2) Media y 3) Fuerte
33. Textura de la superficie de la vaina	1) Lisa, 2) Medio áspera y 3) Áspera
34. Apergaminado en estado seco de la vaina	1) Ausente o muy débil, 2) Débil, 3) Media, 4) Pronunciadas y 5) Muy pronunciadas
35. Constrictiones en el estado seco de la vaina	1) Ausentes o muy ligeras, 2) Ligeras, 3) Medias, 4) Pronunciadas y 5) Muy pronunciadas
36. Tamaño de la semilla	Es el Peso de 100 semillas en estado seco, con base a lo expuesto por el CIAT (1987). 1) Pequeña, 2) Mediana, 3) Grande
37. Forma de la vaina en sección longitudinal media	1) Elíptica estrecha, 2) Elíptica, 3) Elíptica ancha, 4) Ovalada estrecha, 5) Ovalada, 6) Ovalada ancha, 7) Circular, 8) Forma arriñonada estrecha, 9) Arriñonada y 10) Arriñonada ancha
38. Forma de la sección transversal de la semilla	1) Plana, 2) Elíptica y 3) Circular
39. Color de grano	1) De un solo color y 2) Multicolor
40. Color principal del grano	1) Blanco o verdusco, 2) Gris, 3) Amarillo, 4) Color ante (piel), 5) Café, 6) Rojo, 7) Violeta y 8) Negro
41. Número de colores secundarios	1) Ausentes, 2) Uno y 3) Más de uno
42. Color principal secundario	1) Blanco o verdusco, 2) Gris, 3) Amarillo, 4) Color ante (piel), 5) Café, 6) Rojo, 7) Violeta y 8) Negro
43. Distribución del color secundario principal	1) Alrededor del hilio, 2) En rayas, 3) En la mitad del grano y 4) En parches
44. Presencia de venas en la semilla	1) Débil, 2) Media y 3) Fuerte
45. Color del hilio en la semilla	1) Del mismo color y 2) De diferente color
46. Resistencia a <i>Colletotrichum</i>	1) Ausente y 2) Presente
47. Resistencia al mosaico común y al virus I	1) No resistente al mosaico, pero resistente al virus, 2) Resistente al mosaico, pero no resistente al virus y 3) Resistente al mosaico y tolerante al virus

¶ Adaptado de UPOV, 1994.

7.4A. Lista de Abreviaturas

ADN: Ácido desoxiribonucleico

AFLPs: Amplificación de fragmentos de longitud polimórficas

ARN: Ácido ribonucleico

BME: β-mercaptoetanol

BPB: Azul de bromofenol

CTAB: Bromuro de alquiltrimetilo de amonio mixto

dH₂O: Agua destilada

ddH₂O: Agua bidestilada

DNTPs 5': Desoxirribonucleótidos trifosfato

EDTA: Tetracetato de etilendiamina

g: Gramo

h: Hora

ISSRs: Inter-secuencias simples repetidas

min: Minuto

ml: Mililitro

ng: Nanogramo (s) = 10^{-9} gramos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RAPDs: ADN polimórfico amplificado aleatoriamente

RFLPs: Longitudes polimórficas de los fragmentos de restricción

SSRs: Secuencias simples repetidas

TBE: Tris-borato EDTA

TE: Tris EDTA (amortiguador)

μg: Microgramo (s) = 10^{-6} gramos

μl: Microlitro (s) = 10^{-6} litros

M: Molar

mM: milimolar

μM: micromolar

NTSYS: Sistema de taxonomía numérica para análisis multivariado

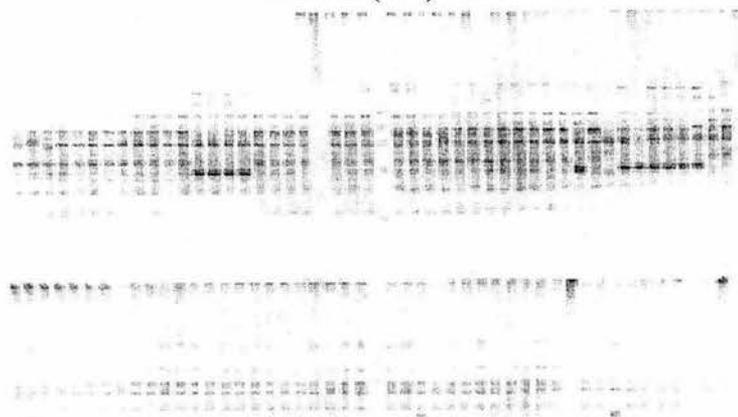
U: Unidades

UPGMA: Promedio aritmético no ponderado para pares de grupos

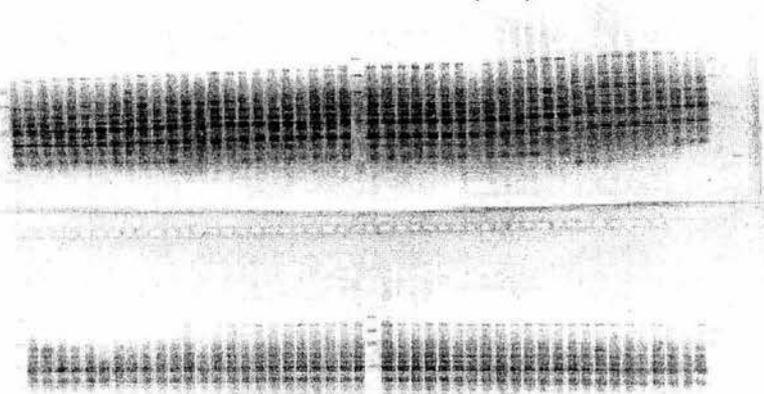
UV: Ultravioleta

7.5A. Análisis electroforético de los productos amplificados de ADN obtenidos con tres diferentes primers para ISSRs.

Primer (CA)8 RT



Primer DBDA (CA)7



Primer (TCC)5 RY

