



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

00361

2ej

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"HIBRIDACION GENOMICA (GISH Y DOT BLOTS)
EN EL COMPLEJO *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus*
(FABACEAE - PHASEOLEAE)"

T E S I S

Que para obtener el Grado Académico de
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

p r e s e n t a

PEDRO MERCADO RUARO

Director de Tesis: Dr. Alfonso Octavio Delgado Salinas

1998

20316

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

A **SARA** con amor y admiración, por su amor, apoyo e infinita confianza.

A **Ann Kenton** (1951-1994)

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alfonso O. Delgado Salinas por su excelente dirección y constante asesoría durante todo el desarrollo de la presente tesis.

A la Dra. Ann Kenton, por sus enseñanzas y darme la oportunidad de incursionar en la citogenética molecular.

A la Dra. Judith Márquez Guzmán, Dra. Guadalupe Palomino Hasbach, Dra. Sandra Gómez Arroyo, Dra. Margarita Collazo Ortega, M. en C. Susana Valencia Ávalos y Dr. Fernando Chiang Cabrera, por aceptar ser parte del jurado revisor del presente trabajo; sus acertadas observaciones y sugerencias lo enriquecieron notablemente.

Al Dr. Michael Bennett, director del Jodrell Laboratory de los Royal Botanic Gardens de Kew y a todo su equipo de trabajo por todo su apoyo y las facilidades otorgadas, así como su gran hospitalidad.

Al Dr. Teófilo Herrera Suárez, por la revisión y observaciones al manuscrito.

Al Instituto de Biología de la UNAM por las facilidades brindadas para la realización del presente trabajo.

Al Consejo Británico (MXC/2501/3) y a la Dirección de Intercambio Académico de la UNAM (122/DI/3720) por el apoyo económico brindado para realizar la estancia en el Jodrell Lab.

De manera especial, al Dr. Antonio Lot y Dr. Alfonso Delgado por su confianza y apoyo constante.

Al Dr. Fernando Chiang, por las revisiones críticas al manuscrito en sus distintas etapas, lo que mejoró de manera notable la edición final del mismo.

Al Dr. Alfonso Delgado, Dr. Héctor Hernández, Dra. Patricia Dávila y Dr. Miguel Ulloa, por las facilidades otorgadas cuando en su momento estuvieron al frente de la jefatura del Departamento de Botánica del IBUNAM.

Al Biól. Alfredo Wong León, por la valiosa asesoría y ayuda brindada en la parte de computación. Siempre dispuesto a resolver los problemas que se presentaron.

A la Biól. Carmen Loyola Blanco y Biól. Samuel Aguilar Ogarrio, por el soporte y asesoría en el aspecto fotográfico.

A los Biólogos David Martínez, Francisco Basurto y Raymundo Ramírez por proporcionar parte del material biológico utilizado en este estudio y por la información de campo del mismo.

A la Biól. Norma Oropeza por su valioso apoyo.

Finalmente, gracias a todos aquellos que de una u otra forma intervinieron para la realización de la presente tesis.

TABLA DE CONTENIDO

I	RESUMEN	1
II	INTRODUCCIÓN	2
III	ANTECEDENTES	4
	Familia Fabaceae	4
	Generalidades de <i>Phaseolus</i>	6
	Estudios cromosómicos en <i>Phaseolus</i>	8
	Complejo <i>Phaseolus vulgaris</i> - <i>P. coccineus</i>	11
	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	12
	<i>Phaseolus coccineus</i> L. subsp. <i>coccineus</i>	12
	<i>Phaseolus coccineus</i> subsp. <i>formosus</i> (Kunth) Maré., Masch. et Stain	13
	<i>Phaseolus coccineus</i> subsp. <i>griseus</i> (Piper) A. Delgado inédito	13
	<i>Phaseolus coccineus</i> subsp. <i>glabellus</i> (Piper) A. Delgado inédito	15
	<i>Phaseolus coccineus</i> subsp. <i>darwinianus</i> Hernández X. et Miranda C.	16
	Estudios cromosómicos en el complejo <i>Phaseolus vulgaris</i> - <i>P. coccineus</i>	18
	Estudios morfológicos, electroforéticos y de hibridación en <i>P. coccineus</i> subsp. <i>darwinianus</i>	19

	Estudios de hibridación en el complejo <i>Phaseolus vulgaris</i> -	
	<i>P. coccineus</i>	22
	Hibridación <i>in situ</i>	24
IV	OBJETIVOS	29
	Objetivo general	29
	Objetivos particulares	29
V	HIPÓTESIS	30
VI	MATERIALES Y MÉTODOS	32
	Hibridación genómica <i>in situ</i> (GISH)	32
	Preparación del material biológico	35
	Obtención de laminillas con cromosomas metafásicos	35
	Extracción del ADN	36
	Marcaje de ADN	38
	Pretratamiento de las laminillas con cromosomas	41
	Preparación de la mezcla de hibridación	41
	Desnaturalización de los cromosomas	42
	Hibridación	42
	Lavados posthibridación	43
	Detección de la hibridación	44

	Amplificación de la señal del ADN marcado con biotín	45
	Contratinción, montaje y visualización	46
	Hibridación de ADN sobre membrana ("DOT BLOTS")	47
	Colocación del ADN en membrana Hybond N ⁺	47
	Prehibridación	48
	Hibridación, lavados y detección de los Dot Blots	49
VII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
	Hibridación genómica <i>in situ</i> (GISH)	52
	Hibridación de Dot Blots	75
VIII	CONCLUSIONES	83
IX	REFERENCIAS	85
X	APÉNDICES	96

RESUMEN

Phaseolus es un género americano bien delimitado con aproximadamente 50 especies; aunque es un grupo que contiene 5 especies con importancia económica, las relaciones genéticas entre las distintas especies que lo conforman no han sido hasta ahora bien determinadas y dentro del género se han establecido complejos taxonómicos. Uno de estos complejos es el de *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus*, el cual está integrado por *P. coccineus* subsp. *coccineus*, *P. coccineus* subsp. *darwinianus* (= *P. polyanthus*), *P. coccineus* subsp. *formosus*, *P. coccineus* subsp. *glabellus*, *P. coccineus* subsp. *griseus* y *P. vulgaris*.

En este trabajo se llevaron a cabo hibridaciones genómicas *in situ* (GISH) y *ex situ* (DOT BLOTS) en los taxa integrantes del complejo *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus*, con la intención de contribuir al entendimiento del origen de *P. coccineus* subsp. *darwinianus* (= *P. polyanthus*), así como para determinar las relaciones genéticas entre los integrantes del complejo. Con la aplicación de las técnicas de hibridación genómica utilizadas en este estudio no fue posible resolver el problema del origen de *P. coccineus* subsp. *darwinianus*, pero sugieren que tiene una mayor cercanía genómica con *P. coccineus* subsp. *coccineus* que con *P. vulgaris*. Del resto de las subespecies integrantes del complejo, se encontró que *P. coccineus* subsp. *glabellus* es la menos relacionada, apoyando así la propuesta de que debe ser excluida del complejo y darle el rango específico; por otro lado, *P. coccineus* subsp. *formosus* fue la más estrechamente relacionada con *P. coccineus* subsp. *coccineus*.

INTRODUCCIÓN

El género *Phaseolus* L. pertenece a la tribu *Phaseoleae* de la familia Fabaceae, la cual consta de aproximadamente 650 géneros y 18,000 especies.

Los estudios citogenéticos realizados en *Phaseolus* han sido dirigidos principalmente a la determinación del número cromosómico, estableciéndose como el básico en el grupo a $x= 11$; existen pocos trabajos en los que se hace referencia a otros tipos de estudios, como el bandeo cromosómico, contenido de ADN nuclear o la utilización de marcadores moleculares y de estos principalmente son empleadas las especies cultivadas.

No obstante que el género *Phaseolus* quedó bien delimitado después de las investigaciones realizadas por Verdcourt (1970), el número de especies y las relaciones genéticas entre ellas no han sido bien establecidos (Debouck, 1991). El complejo *Phaseolus vulgaris*-*P.coccineus* integrado, según Delgado-Salinas (1985), por *P. coccineus* subsp. *coccineus*, *P. coccineus*. subsp. *formosus*, *P. coccineus*. subsp. *glabellus*, *P. coccineus* subsp. *griseus* , *P. coccineus*. subsp. *darwinianus* y *P. vulgaris*, se encuentra en esta situación; los objetivos del presente trabajo son aportar evidencias que ayuden a esclarecer el origen de *P.*

coccineus subsp. *darwinianus* y determinar la similitud génica que existe entre las distintas especies y subespecies que integran al complejo *P. vulgaris*-*P. coccineus* (*sensu* Delgado, 1985), para lograr lo anterior se aplican técnicas de citogenética molecular: hibridación genómica *in situ* y *ex situ* (**GISH** y **DOT BLOTS**).

ANTECEDENTES

FAMILIA FABACEAE

Conocida más comúnmente como Leguminosae, la familia Fabaceae está integrada por las subfamilias Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae, aunque, para algunos autores, entre ellos Cronquist (1988), cada una de ellas debería ser considerada como familia independiente. El origen y las relaciones de las fabáceas con otras familias son aspectos que todavía no han sido aclarados; no obstante, las cesalpinioideas y mimosoideas son las subfamilias que se consideran más primitivas por el registro fósil de restos de madera y granos de polen encontrados con una antigüedad de 65-70 millones de años (Raven y Polhill, 1981; Herendeen *et al.*, 1992).

A nivel mundial la familia ocupa el tercer lugar en el número de especies (National Academy of Sciences [NAS], 1979; Polhill *et al.*, 1981), pero en la República Mexicana se ubica en el segundo lugar, con 135 géneros y 1724 especies (Sousa y Delgado, 1993), superada únicamente por la familia Asteraceae. Aunque las leguminosas están distribuidas en todo el país, hay un mayor número de especies en las regiones tropicales (Sousa y Delgado, 1993), siendo los estados de Oaxaca y Chiapas los más ricos, como resultado del traslapo de varias provincias florísticas en los límites entre ambos estados (Sousa,

1986). La familia Fabaceae se distribuye en todos los hábitats terrestres; sin embargo, existe una mayor diversidad en áreas de topografía variada y con climas estacionales (Polhill *et al.*, 1981).

Debido a su amplia distribución, por ser fijadoras de nitrógeno, y por su número de especies y tipos de crecimiento, las leguminosas juegan un papel preponderante en las diferentes comunidades en que se desarrollan, siendo llamativas al hombre desde hace varios milenios. Dentro de los muchos usos que tienen algunas especies de esta familia, destaca el que varias de ellas son usadas para la construcción de viviendas, fijadoras de suelo, abono verde, cobertura, ornato, medicinal, insecticida, cercas, como alimento humano o como forraje, ocupando en estos dos últimos rubros el segundo lugar de utilidad, superadas únicamente por las gramíneas, pero con un contenido proteico dos o tres veces superior y con muchas especies que tienen un alto potencial de ser explotadas (NAS, 1979). De acuerdo con Lackey (1981), uno de los grupos dentro de la familia con mayor importancia en cuanto a la alimentación humana, forraje u ornato, es la tribu Phaseoleae de la subfamilia Papilionoideae. Esta tribu concentra una gran cantidad de géneros con importancia económica, destacando *Glycine* (soya), *Phaseolus* (frijol) y *Vigna* (frijoles asiáticos). *Phaseolus* consta de aproximadamente 50 especies, con cuatro (Delgado-Salinas, 1985) o cinco

(Debouck, 1991) de ellas cultivadas: *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *P. lunatus*, *P. polyanthus* (= *P. coccineus* subsp. *darwinianus*).

Lo antes mencionado refleja la importancia que puede tener el estudio de este grupo taxonómico desde múltiples enfoques, algunos de los cuales son los taxonómicos, biosistemáticos y citogenéticos.

GENERALIDADES DE *Phaseolus* L.

La posición taxonómica de *Phaseolus* es la siguiente:

Familia:	Fabaceae
Subfamilia:	Papilionoideae
Tribu:	Phaseoleae DC. (1825)
Subtribu:	Phaseolinae Benth. (1837)
Género:	<i>Phaseolus</i> L. (1753)

Phaseolus es un género americano con cerca de 50 especies (Debouck, 1991) perteneciente a la familia Fabaceae (Leguminosae), que se distribuye principalmente en las montañas mexicanas (Sousa y Delgado, 1993).

En la descripción inicial de *Phaseolus*, Linneo consideró únicamente 11 especies pero, con el paso del tiempo, el número se fue incrementando hasta llegar a ser más de 200 distribuidas en el Viejo y el Nuevo Mundo, muchas de ellas con características disímiles que hacían dudar acerca de la naturaleza del género. En 1970, Verdcourt redefine a *Phaseolus*, considerándolo únicamente con aproximadamente 50 especies, todas ellas del Nuevo Mundo y cuyas características son similares a *P. vulgaris* (especie tipo). Esta redefinición fue avalada y refinada por una serie de trabajos posteriores (Maréchal *et al.*, 1978; Lackey, 1981, 1983). De esta forma, el grupo quedó integrado por tres secciones: *Phaseolus*, *Minkelersia* y *Alepidocalyx*, las que posteriormente Lackey (1983) redujo a dos, al unir *Alepidocalyx* con *Minkelersia*, estableciendo de esta manera las secciones *Phaseolus* y *Minkelersia*. Maréchal *et al.* (1978) consideran que las características que definen al género y que lo diferencian de *Vigna* (género afín) son las siguientes: 1) Estípulas sin apéndices, no lobuladas; 2) presencia de pelos en forma de gancho; 3) brácteas florales persistentes en antesis; 4) nudos del raquis de la inflorescencia no protuberantes; 5) estandarte simétrico; 6) estilo en espiral (1.5-2 vueltas); 7) estilo caduco, no persistente en el fruto y 8) fruto sin septos.

La última revisión del género es la realizada por Delgado-Salinas (1985) en donde reconoce únicamente 36 especies para Norte y Centroamérica, distribuidas

en 4 secciones: *Phaseolus*, *Minkeliersia*, *Chiapasanii* y *Xanthotrichii*. No obstante los estudios taxonómicos efectuados en el género y que han llevado a su clara delimitación, las relaciones genéticas entre sus especies no han sido hasta ahora bien establecidas (Debouck, 1991) y lo mismo ocurre en cuanto al número de ellas ya que, mientras Delgado-Salinas (1985) estima 36 especies, algunas de ellas con divisiones subespecíficas, para Debouck (1991) son 52 especies las que deben de ser consideradas, todas ellas sin divisiones subespecíficas, .

ESTUDIOS CROMOSÓMICOS EN *Phaseolus*

Los estudios citogenéticos, junto con los morfológicos, anatómicos, fisiológicos, ecológicos, etc., han sido señalados como herramientas importantes para la elaboración de mejores clasificaciones taxonómicas, así como para el entendimiento de las relaciones y tendencias evolutivas de los distintos niveles taxonómicos de los organismos (Thomas, 1973; Green *et al.*, 1980; Almeda y Chuang, 1992). Técnicas como el bandeo cromosómico y el análisis meiótico hacen posible el conocimiento del genoma y las relaciones cromosómicas (Heslop-Harrison, 1992).

Goldblatt (1981) propone que el número cromosómico básico para las fabáceas es $x=7$, actualmente sólo presente en *Cercis* (Caesalpinioideae). A partir

de $x=7$ se dio una poliploidía temprana acompañada de aneuploidías con pérdida o ganancia de cromosomas, originando con ello desviaciones del poliploide $n=14$ y dando como resultado toda una serie de números cromosómicos básicos en los diferentes géneros de las leguminosas. Posteriormente se han presentado poliploidías en grupos como *Leucaena* en el que en algunas especies se ha registrado un número diploide ($2n$) por arriba de los 100 cromosomas (Kumari y Bir, 1985).

No obstante la importancia señalada en los estudios citogenéticos, la mayoría de ellos han estado dirigidos a las especies que tradicionalmente han mostrado alguna utilidad, dejando de lado la potencialidad que pueden tener las especies silvestres que están relacionadas o emparentadas con las cultivadas. Tal es el caso de *Phaseolus* en el que de las 50 especies reconocidas, únicamente en 25 se ha determinado su número cromosómico (Mercado-Ruaro y Delgado Salinas, 1996). Lackey (1979), Goldblatt (1981) y Mercado-Ruaro y Delgado-Salinas (1996) proponen, con base en los reportes disponibles, que al igual que en la tribu *Phaseoleae*, el número cromosómico básico en el género es $x=11$, existiendo un número haploide de $n=10$ en 3 especies: *P. leptostachyus*, *P. micranthus* y *P. macvaughii* (Mercado-Ruaro y Delgado-Salinas, en prensa). La cantidad de especies que han sido examinadas cariotípicamente es muy bajo, siendo el trabajo de Mercado-Ruaro y Delgado-Salinas (en prensa) el que

proporciona un análisis cariotípico en 10 especies silvestres y que representan en promedio al 20% de las integrantes del género. La carencia de estudios cariológicos en el género se ha atribuido al tamaño muy pequeño de los cromosomas que dificulta dicho análisis (Hucl y Scoles, 1985; Zheng *et al.*, 1991).

Algunos autores (Sarbhoy, 1977, 1980; Sinha y Roy, 1979a, 1979b) han señalado que, en la evolución cariotípica del grupo han estado involucradas principalmente las inversiones pericéntricas y paracéntricas, translocaciones y pérdida o ganancia de cromatina. También proponen que el cariotipo en *Phaseolus* ha evolucionado hacia una asimetría, con una disminución en el contenido total de la cromatina. Los resultados obtenidos por Mercado-Ruaro y Delgado-Salinas (en prensa) señalan, de las especies que analizan, a *P. filiformis* como la más primitiva cariotípicamente por presentar todos sus cromosomas metacéntricos y una baja longitud cromosómica, ambas características señaladas como primitivas en la mayoría de las angiospermas (Stebbins, 1971). Mercado-Ruaro y Delgado-Salinas (en prensa) mencionan que la aneuploidía también ha jugado un papel en la evolución del cariotipo al encontrar tres especies aneuploides con $2n= 20$.

COMPLEJO *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus*

La falta de claridad respecto al número de especies que integran el género y de las relaciones filogenéticas entre ellas, ha propiciado el origen de complejos o grupos taxonómicos aún sin una definición clara (Delgado-Salinas, 1985), sobre todo dentro de la sección *Phaseolus*, resaltando el complejo taxonómico *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus*, cuyos integrantes se encuentran estrechamente relacionados y son de importancia económica.

El complejo *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus* se considera integrado por *P. coccineus* subsp. *coccineus* (= COC), *P. coccineus* subsp. *formosus* (= FOR), *P. coccineus* subsp. *glabellus* (= GLA), *P. coccineus* subsp. *griseus* (= GRI), *P. coccineus* subsp. *darwinianus* (= DAR) y *P. vulgaris* (= VUL) (Delgado-Salinas, 1985). La problemática taxonómica existente en cuanto a las especies que deben integrar el género se ejemplifica con GLA y DAR, a quienes Delgado-Salinas (1985) las considera subespecies de *P. coccineus*, mientras que en publicaciones recientes algunos autores (Debouck, 1991; Llaca *et al.*, 1994; Gepts, 1996) las señalan como merecedoras del rango de especie.

De los taxa que integran al complejo *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus*, FOR, GRI y GLA son exclusivamente silvestres, mientras que COC, DAR y VUL son

especies cultivadas que cuentan con su contraparte silvestre. En la tabla 1 se resumen en forma comparativa varias características morfológicas que permiten distinguir a los integrantes del complejo *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus*.

***Phaseolus vulgaris* L.**

Son plantas herbáceas anuales o raramente enredaderas perennes de amplia distribución desde el oeste de México en Durango, hasta Guatemala, El Salvador y Honduras en bosques de encino, pino-encino o en comunidades secundarias, en altitudes de 800 a 1900 msnm. Delgado-Salinas (1985) menciona 3 variedades: *Phaseolus vulgaris* var. *vulgaris*, es donde se incluye a todas las formas cultivadas; *P. vulgaris* var. *aborigineus* y *P. vulgaris* var. *mexicanus* ambas variedades son silvestres pero con distinta distribución. la primera de ellas se encuentra en América del Sur, mientras que la segunda se localiza en América del Norte. El color de la flor es violeta, rosa o blanco; semillas oblongas, arriñonadas de coloración gris, café o negro.

***Phaseolus coccineus* L. subsp. *coccineus*.**

Esta subespecie es la que contiene a todas las formas cultivadas (Delgado-Salinas, 1985) en las regiones tropicales de altura y templadas. Es el frijol que produce las semillas más voluminosas y con flores de color escarlata, blancas o

bicolores (Maréchal *et al.*, 1978), raíz tuberosa, hilo de la semilla oblongo-ovado con epihilo (Delgado-Salinas, 1985).

***Phaseolus coccineus* subsp. *formosus* (Kunth) Maré., Masch. et Stain.**

Son poblaciones de plantas que pueden aparecer en ambientes silvestres o, en muchas ocasiones, como poblaciones ferales, cercanas a campos de cultivo, donde se siembra a *P. coccineus* subsp. *coccineus*. Son plantas malezoides bien establecidas o naturalizadas, con una amplia distribución en la República Mexicana y con una numerosa sinonimia resultado de los diferentes morfotipos que se pueden reconocer (Delgado-Salinas, 1985). La fuerte vellosidad de las bractéolas y la presencia de colpos en los granos de polen son las características distintivas del taxon (Maréchal *et al.*, 1978).

***Phaseolus coccineus* subsp. *griseus* (Piper) A. Delgado comb. nov.**

Son poblaciones silvestres que se distribuyen a lo largo de la Sierra Madre Occidental, en la parte occidental del Eje Volcánico Transversal y Sierra Madre del Sur, en bosques de encino, pino-encino, bosques tropicales caducifolios y en matorrales xerófitos, en altitudes de 610 a 2250 msnm (Delgado-Salinas, 1985). Las características que permiten distinguirla de otras subespecies de *P. coccineus* son sus bracteólas pequeñas y ovadas y vainas con numerosas semillas (de 6 a 9).

Tabla 1. Características distintivas de los taxa integrantes del complejo *Phaseolus vulgaris-P. coccineus* (Delgado-Salinas, 1985).

CARÁCTER	COC	DAR	FOR	GLA	GRI	VUL
Hábito	enredadera, perenne	enredadera, anual y bianual	enredadera, perenne	enredadera, perenne	enredadera, perenne	enredadera o mata, anual
Pubescencia en follaje	presente	presente	presente	carente, glabro	presente	presente
Folíolos	opacos	opacos	opacos	lustrosos	opacos	opacos
Inflorescencias (disposición de fascículos florales)	dispersos a lo largo del raquis	dispersos a lo largo del raquis	dispersos a lo largo del raquis	aglomerados distalmente	dispersos a lo largo del raquis	dispersos a lo largo del raquis
Abscisión floral	++++	++++	++++	++	++++	++++
Bractéolas, tamaño/caliz, forma	la mitad del tamaño del cáliz; ovadas-lanceoladas	del tamaño del cáliz; ovadas-lanceoladas	del tamaño y ancho del cáliz, ovadas	diminutas en la base del cáliz, ovadas	la mitad del tamaño del cáliz, ovado-lanceoladas	del tamaño del cáliz, ovado-acorazonadas
Flor-color	rojo-anaranjado alas estandarte del mismo color	blanco o lila	blanco, lila, rojo-anaranjado	rojo, con alas y quilla rosadas	rojo-anaranjado	blanco o lila
Lígula en la lámina interna del estandarte	-	-	-	+	-	-
Tamaño de las alas con respecto a la quilla	alas > quilla	alas > quilla	alas > quilla	alas ≈ quilla	alas > quilla	alas > quilla
Estigma, posición	extrorso, subapical	introrso, subapical	extrorso, subapical	extrorso	extrorso, subapical	introrso, subapical
Fruito-valvas	> rugosas	rugosas	> rugosas	lisas	lisas	lisas
No. semillas	4-6 (8)	4-6 (8)	4-6	6-9	6-9	5-7
Germinación de la plántula	hipogea	epigea	hipogea	hipogea	hipogea	epigea
Hábitat	cultivo con maíz y otros frijoles; poblaciones ferales	cultivo con maíz y otros frijoles; poblaciones ferales	selva baja caducifolia, encinar, pinares	bosque mesófilo de montaña y vegetación secundaria	bosque mesófilo, encinar, pinar	cultivo con maíz o bosque mesófilo de montaña, encinar-pinar

***Phaseolus coccineus* subsp. *glabellus* (Piper) A. Delgado**

La subespecie **GLA** está integrada por poblaciones silvestres distribuidas en bosque mesófilo de montaña y vegetación secundaria, cuyo origen son las regiones altas del noreste de México. Maréchal *et al.* (1978) le confieren la categoría de especie (*Phaseolus glabellus*). Sin embargo, Delgado-Salinas (1985) en su estudio sistemático sobre *Phaseolus* la considera subespecie de *P. coccineus*. Las características morfológicas distintivas de este taxon son las bractéolas pequeñas y el follaje glabro (Maréchal *et al.*, 1978), además de un perfil proteínico distinto al del resto de las especies y subespecies que integran al complejo, lo que hace dudar acerca de su posición como subespecie; por lo que, Debouck (1991) le da nuevamente el rango de especie. La posición de Debouck es reforzada por los estudios de ADN de cloroplastos realizados por Llaca *et al.* (1994), Gepts (1996) y Schmit *et al.* (1996), quienes encuentran que **GLA** está muy distante del resto de los taxa pertenecientes al complejo *Phaseolus vulgaris-P. coccineus* y sugieren que debe ser reclasificada como una especie diferente y fuera del complejo.

Como se ha señalado al inicio de la presente investigación, existen argumentos que ponen en duda la pertenencia de **GLA** dentro del complejo *Phaseolus vulgaris-P. coccineus*, razón por la cual se ha incluido en este estudio, con la intención de aportar otro tipo de evidencias que ayuden a clarificar la

situación de este taxon dentro del complejo. Las evidencias vertidas en el párrafo anterior soportan el que GLA es una especie independiente a COC y al resto de los taxa integrantes de dicho complejo, postura que también es reforzada por los resultados obtenidos en este estudio, como se expresa más adelante, en la sección correspondiente.

***Phaseolus coccineus* subsp. *darwinianus* Hernández X. et Miranda C.**

Son poblaciones cultivadas junto con el maíz y otras especies de frijol. El área de distribución de DAR ha sido señalada como de transición ecológica y es una franja entre 1500 y 2300 msnm de la escarpa oriental húmeda de la Sierra Madre Oriental, del lado sur de Oaxaca, de la Sierra de San Cristóbal, Chiapas y en la región montañosa del occidente de Guatemala (Hernández X. *et al.*, 1959), encontrándose también poblaciones escapadas. Hernández X. *et al.* (1959) proponen que DAR es el resultado de la cruce entre las especies COC y VUL, observándose actualmente una mayor afinidad con COC, posiblemente como resultado de una mayor retrocruza con este último.

La detección del híbrido entre COC y VUL, se obtuvo después de una amplia revisión del material disponible en el banco de plasma germinal El Horno en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias por parte de Hernández X. *et al.* (1959). El reconocimiento de los híbridos se basó

principalmente en las características morfológicas de la semilla, localizadas la mayoría de ellas en el hilo. El análisis y la graficación de los datos permitió establecer la presencia de una población discreta en posición intermedia entre los dos progenitores; dicha población, de acuerdo con estos autores, corresponde a DAR y cuyo origen sugieren es anterior al descubrimiento del Continente Americano.

DAR presenta una germinación epigea, pedúnculo corto como VUL y un estigma externo como en COC, caracteres que para Maréchal *et al.* (1978) también les sugieren que se trata de un híbrido. La discusión alrededor de DAR, aparte de su origen, incluye el nombre que le debe ser asignado; Maréchal *et al.* (1978) la citan como *P. coccineus* subsp. *polyanthus*, mientras que para Debouck (1991) es *P. polyanthus* Greenman, pero reconociendo su cercana afinidad con COC y VUL.

A diferencia de GLA, y no obstante que han sido muchos los estudios que se han realizado en torno a DAR, existen aún mucha discusión y dudas sobre su origen y posición taxonómica.

ESTUDIOS CROMOSÓMICOS EN EL COMPLEJO *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus*

Todas las especies y subespecies integrantes del complejo presentan un número cromosómico de $2n=22$. *Phaseolus coccineus* tiene un cariotipo formado por 6 cromosomas metacéntricos (m) y 5 submetacéntricos (sm), mientras que *P. vulgaris* presenta una fórmula cariotípica de 5 metacéntricos + 5 submetacéntricos + 1 subtlocéntrico (st) (Zheng *et al.*, 1991) y *P. coccineus* subsp. *darwinianus* silvestre tiene el cariotipo más simétrico, con 9 metacéntricos + 2 submetacéntricos (Mercado-Ruaro y Delgado-Salinas, en preparación).

Hernández X. *et al.* (1959) también realizan estudios para observar el comportamiento de los cromosomas durante la meiosis del híbrido propuesto y de sus posibles progenitores. Encuentran que VUL presenta una meiosis normal, independientemente de que DAR se localice o no en la misma área; en cambio, el comportamiento de COC depende de la presencia del híbrido. Cuando DAR está ausente, la división meiótica de COC es normal, con la formación de 11 bivalentes durante la diacinesis y metafase I y el resto de las fases con comportamiento igualmente normal. En sitios donde se encuentra en contacto con DAR, estos autores observan cromosomas retardados que no llegan a los polos en un porcentaje que oscila del 5 al 10%. El análisis cromosómico en meiosis de DAR les

permite detectar de manera esporádica la formación de 10 bivalentes y 2 univalentes, aunque lo normal cuando no se trata de especies híbridas, poliploides o con algún tipo de rearme cromosómico es encontrar 11 bivalentes. En la anafase I también encuentran cromosomas retardados. El porcentaje de aberraciones cromosómicas observadas en el híbrido fue del 25 al 50%. Todas estas observaciones, junto con las morfológicas, les llevó a sugerir una mayor afinidad filogenética entre COC y DAR. En estudios recientes de Mercado-Ruaro (no publicados) realizados en poblaciones cultivadas de DAR en Nauzontla, Puebla, que se encuentran en contacto con poblaciones cultivadas de COC, también se han detectado cromosomas retardados.

ESTUDIOS MORFOLÓGICOS, ELECTROFORÉTICOS Y DE HIBRIDACIÓN EN *Phaseolus coccineus* subsp. *darwinianus*.

Por la hipótesis de un origen híbrido y por la importancia en la dieta humana en algunas regiones de México y Centroamérica, DAR ha recibido una mayor atención en cuanto al número de estudios morfológicos, electroforéticos y de hibridación, como se puede apreciar en la información contenida en los siguientes párrafos.

Smartt (1973) al analizar el problema del origen de DAR, considera que la semejanza que existe entre las tres entidades taxonómicas involucradas (COC, DAR y VUL) puede ser debida a un origen común de una forma ancestral y no a causa de la hibridación y propone que, bajo estas condiciones, DAR puede ser tratada como una especie distinta; este mismo punto de vista es apoyado más tarde con evidencias por Schmit y Debouck (1991). La opinión de Smartt (1973) está basada en observaciones sobre la cantidad de óvulos por vaina: en COC y VUL hay una variación de 5 a 10, mientras que en DAR la cantidad es de 3 a 5; el hilo de la semilla tampoco se ajusta a una posición intermedia en la subsp. *darwinianus*, en la cual se presenta más largo y circular que en los supuestos progenitores. Aparte de estas características, Smartt (1973) se apoya también en los estudios realizados por Kloz y Klozova (1968) sobre la movilidad electroforética de la albumina obtenida de extractos de semillas de *Phaseolus*. Dichos trabajos permitieron observar que hay una menor velocidad en *Phaseolus polyanthus* (DAR) cuando se compara con COC y VUL, en el caso de ser un híbrido, se esperaría una movilidad intermedia entre los dos progenitores. Con base en lo señalado anteriormente, Smartt (1973) considera que la decisión de asignarle la categoría de subespecie fue muy conservadora por parte de Hernández X. *et al.* (1959) y que se hace necesario un juicio taxonómico para determinar el nombre que debe ser adoptado, ya que la descripción y diagnosis de DAR se parecen a la proporcionada para *P. polyanthus* (Piper, 1926).

ESTUDIOS DE HIBRIDACIÓN EN EL COMPLEJO *Phaseolus vulgaris* - *P. coccineus*.

Debido a la importancia económica que tienen *Phaseolus vulgaris* y *P. coccineus*, se han efectuado varios trabajos de hibridaciones artificiales entre ambas especies (Lamprecht, 1941; Coyne, 1964; Thomas, 1964; Al-Yasiri y Coyne, 1966; Smartt y Haq, 1972; Haq *et al.*, 1980, entre otros). La obtención artificial de híbridos entre COC y VUL está documentada desde el siglo pasado en los trabajos de Mendel (Braak y Kooistra, 1975). Los híbridos son logrados sin dificultad, como ya se mencionó, cuando VUL actúa como parte materna, mientras que la crucea recíproca, aunque se consigue, es menos exitosa. En este mismo sentido, Miranda (1967) señala que se realiza más fácilmente la hibridación cuando se utilizan variedades que provienen de regiones donde se cultivan las tres entidades taxonómicas.

Maréchal (1971) advierte una reducción en el número de quiasmas y no apareamiento de algunos cromosomas cuando realiza la crucea artificial entre COC y VUL. De acuerdo con este autor, sus resultados no concuerdan con lo encontrado por Lamprecht (1941), quien documentó la formación de 11 bivalentes para esta crucea. Miranda (1967) también lleva a cabo el mismo tipo de crucea artificial, en donde además incluye a *P. coccineus* subsp. *darwinianus* y elabora

diagramas de dispersión entre distintas variedades de COC, VUL y el supuesto híbrido natural resultante entre ambos, determina el índice de hibridación y observa que el híbrido natural siempre se sitúa entre los dos progenitores, aunque presenta una mayor cercanía con COC. La similitud morfológica que tiene DAR con COC es explicada por Miranda (1967) al señalar que una vez logrado el híbrido natural interespecífico, se retrocruza constantemente con COC con lo que recupera características de este último, conclusiones similares a las que han llegado en diversas investigaciones realizadas más recientemente. Otros estudios de hibridación artificial son los de Smartt (1970), quien al igual que Camarena y Baudoin (1987), mencionan la ventaja de utilizar a VUL como progenitor materno. No obstante el éxito que se ha tenido al hibridar COC con VUL, ningún autor menciona que el híbrido resultante sea similar al DAR actual. La razón puede estar en el tiempo transcurrido desde la aparición del híbrido que, de acuerdo con Hernández X. *et al.* (1959), es anterior al descubrimiento de América y en el número de retrocruzas que han ocurrido desde entonces, determinado así las características genéticas y fenotípicas actuales de DAR.

Es interesante mencionar que varios de los híbridos logrados entre diferentes especies del género *Phaseolus*, han requerido el uso de medios de cultivo de tejidos *in vitro* para que los embriones se desarrollen y en algunos casos se han podido obtener plantas adultas (Braak y Kooistra, 1975; Mok *et al.*, 1978;

Rabakoarihanta *et al.*, 1980; Sabja *et al.*, 1990), indicando que aparentemente no hay dificultad para la fusión de los gametos y que la incompatibilidad observada es poscigótica, dando como resultado el aborto del cigoto o la producción de semillas no viables. Con el empleo de medios de cultivo descritos para cultivo de tejidos *in vitro*, dicha incompatibilidad ha sido eliminada en algunas de las cruzas realizadas [p.ej., *Phaseolus vulgaris* x *P. ritensis* (Braak y Kooistra, 1975); *P. vulgaris* x *P. acutifolius* (Honma, 1956; Rabakoarihanta *et al.*, 1980); *P. coccineus* x *P. acutifolius* (Alvarez *et al.* 1981)].

HIBRIDACIÓN *in situ*

La hibridación *in situ* (ISH por sus siglas en inglés) es una técnica que permite la formación de híbridos moleculares entre ácidos nucleicos en solución y el ARN o ADN de las células o tejidos colocados previamente en laminillas citológicas. La técnica fue descrita casi simultáneamente por Gall y Pardue (1969) y John *et al.* (1969) y, en ambos casos, se emplean células de un sapo africano del género *Xenopus*, colocadas en portaobjetos. La hibridación está basada en la desnaturalización y realineación de los ácidos nucleicos y fue inicialmente concebida con la idea de hibridar ARN radiactivo en solución, con el ADN de células contenidas en laminillas citológicas, y de esta forma detectar *in situ* la posición que ocupa una secuencia específica de ADN en un cromosoma en

particular (Sessions, 1996; Leitch *et al.*, 1997), después de llevar a cabo la hibridación y exponer la laminilla a una película fotográfica. Ahora la hibridación *in situ* es usada principalmente para la localización y visualización de segmentos de ácidos nucleicos (ADN o ARN) que han sido aislados o secuenciados y que están presentes en el citoplasma, organelos, cromosomas o núcleos. Actualmente ya no se utiliza únicamente el ARN en solución, sino que se realizan de manera muy frecuente hibridaciones ADN-ADN.

La hibridación *in situ* es muy importante en el área clínica ya que permite detectar trisomías, monosomías o nulisomías u otro tipo de anormalidades, como deleciones, duplicaciones y translocaciones. Una de las modificaciones que ha sufrido la técnica con el paso del tiempo es la substitución de material radiactivo por fluorocromos para la detección de la hibridación, reduciendo así el riesgo que implica el empleo de radiactividad y posibilitando además la visualización inmediata y directa en el microscopio de fluorescencia. Se usan las siglas **FISH** para indicar cuando se utilizan fluorocromos ("fluorescent *in situ* hybridization") en la identificación de determinados fragmentos y diferenciarla de otro tipo de método. La hibridación *in situ*, llamada también hibridación histoquímica o citológica, difiere de otras técnicas al permitir la localización física en el genoma de secuencias específicas de ADN o ARN *in situ*.

Cuando se emplean técnicas como las de "Southern", "Northern" o la de "Dot Blots", en las que se utilizan soportes sólidos, como puede ser una membrana, para la detección de la presencia de segmentos particulares de ADN aislado, todo el procedimiento de hibridación es *ex situ*, lo cual impide la visualización de la posición que guarda determinado segmento clonado o aislado en un cromosoma en particular u organelo celular; no obstante, por la intensidad de la hibridación, es posible evidenciar de una manera cualitativa la existencia y magnitud de la hibridación y por lo tanto la similitud génica existente entre dos genomas.

Schwarzacher *et al.* (1989) propusieron el término de "genomic *in situ* hybridization" (**GISH**) para indicar el uso de todo el ADN genómico marcado de una especie como prueba durante la hibridación genómica, mientras que lo que se conoce como "fluorescent *in situ* hybridization" (**FISH**), utiliza como prueba secuencias cromosómicas clonadas o aisladas y marcadas con fluorocromos. Leitch *et al.* (1994) mencionan que **GISH** es una herramienta poderosa que posibilita la visualización de pruebas de ADN en tejidos, células, núcleos y cromosomas, de tal forma que la localización de los ácidos nucleicos puede ser determinada *in situ*. Las condiciones a que son sometidos los ácidos nucleicos con esta técnica permite una hibridación entre secuencias de nucleótidos que tengan al menos entre 80-85% de homología (Schwarzacher *et al.*, 1989). A **GISH** se le

han encontrado varias aplicaciones; destacan, por ejemplo, el que puede ser empleada para estudios de filogenia o citogenética evolutiva (Parokonny *et al.*, 1992), en la discriminación y localización de cromosomas en un genoma alopoliploide (Bennett *et al.*, 1992), translocaciones intergenómicas (Jellen *et al.*, 1994), identificación de secuencias de ADN en un genoma nuclear de una planta que contiene secuencias de ADN de más de una fuente (Schwarzacher *et al.*, 1989; Callimassia *et al.*, 1994), identificación de la presencia y tamaño de segmentos de genomas externos, adiciones cromosómicas, sustituciones, intercambios u otro tipo de rearrreglos cromosómicos (Schwarzacher *et al.*, 1989), o para distinguir visualmente en el núcleo celular a genomas que difieren en composición molecular (Kenton *et al.*, 1997).

Parokonny *et al.* (1992) demuestran la especificidad de **GISH** para discriminar cromosomas en híbridos del género *Gibasis* (Commelinaceae), de los cuales se conoce a los progenitores. Al utilizar híbridos de *G. karwinskiana* x *G. consobrina* y marcando el ADN total de uno de los progenitores como prueba, sólo la mitad del complemento cromosómico del híbrido fue detectado con la marca, mientras que el resto de los cromosomas pertenecientes al otro progenitor no fueron marcados. Resultados similares han sido documentados en híbridos de *Avena* (Chen y Armstrong, 1994), *Lolium* x *Festuca* (Thomas *et al.*, 1994) y *Lathyrus* (Callimassia *et al.*, 1994).

Una de las áreas en las que **GISH** puede tener un gran impacto es en estudios de filogenia, en la detección e identificación de genomas ancestrales en híbridos o alopoliploides de los que se desconoce, pero se sospecha, acerca de los progenitores que les dieron origen. Ejemplos de esta aplicación son los estudios realizados en *Millium montianum* (Bennett *et al.*, 1992), o en *Nicotiana tabacum* (Kenton *et al.*, 1993). En el caso de *M. montianum* se demuestra que uno de los progenitores de este alopoliploide es *M. vervenale*, como ya había sido propuesto después de llevar a cabo estudios cariotípicos que incluyen bandeo cromosómico, pero que no se pudo afirmar categóricamente, ya que la sospecha sólo estaba basada en la morfología de los cromosomas y en la similitud de bandas cromosómicas; la hibridación total del ADN nuclear de *M. vervenale* con estos cromosomas morfológicamente similares permite establecer con certeza que efectivamente se trata de uno de los progenitores que da origen a *M. montianum*.

En lo que se refiere a estudios de hibridación genómica en el género *Phaseolus*, existe el trabajo de Frediani *et al.* (1993) quienes, utilizando la hibridación *in situ*, han visualizado la posición de los genes que codifican para la proteína PGIP (Polygalacturonase-Inhibiting Protein) en *Phaseolus vulgaris*: sus resultados han permitido establecer que dicha secuencia se encuentra localizada en la región heterocromática pericentromérica del cromosoma metacéntrico 10. Otros registros son los de Schumann *et al.* (1990) y Nenno *et al.* (1993), quienes

han documentado la ubicación cromosómica del gen de la faseolina. Todos los estudios han sido realizados en los cromosomas politénicos de *Phaseolus vulgaris*. Lo anterior pone de manifiesto la potencialidad de la hibridación *in situ* en el mapeo cromosómico.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Aportar evidencias de citogenética molecular que ayuden a esclarecer el problema del origen de *P. coccineus* subsp. *darwinianus* y la posición taxonómica de *P. coccineus* subsp. *glabellus*, además de determinar las relaciones genéticas entre los distintos taxa que integran el complejo *P. vulgaris*-*P. coccineus*, utilizando para ello la hibridación genómica [GISH y de **DOT BLOTS** (manchas de punto)].

OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Con la aplicación de la hibridación de **GISH** y de **DOT BLOTS**:
 - a) Establecer si *Phaseolus coccineus* subsp. *darwinianus* es un híbrido cuyos progenitores son *P. coccineus* y *P. vulgaris*.

han documentado la ubicación cromosómica del gen de la faseolina. Todos los estudios han sido realizados en los cromosomas politénicos de *Phaseolus vulgaris*. Lo anterior pone de manifiesto la potencialidad de la hibridación *in situ* en el mapeo cromosómico.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Aportar evidencias de citogenética molecular que ayuden a esclarecer el problema del origen de *P. coccineus* subsp. *darwinianus* y la posición taxonómica de *P. coccineus* subsp. *glabellus*, además de determinar las relaciones genéticas entre los distintos taxa que integran el complejo *P. vulgaris*-*P. coccineus*, utilizando para ello la hibridación genómica [GISH y de DOT BLOTS (manchas de punto)].

OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Con la aplicación de la hibridación de GISH y de DOT BLOTS:
 - a) Establecer si *Phaseolus coccineus* subsp. *darwinianus* es un híbrido cuyos progenitores son *P. coccineus* y *P. vulgaris*.

b) Utilizando poblaciones silvestres y cultivadas, determinar si *P. coccineus* subsp. *darwinianus* es una derivación directa de *P. coccineus*.

II. Determinar si las diferencias morfológicas y de ADN de cloroplastos observadas en *P. coccineus* subsp. *glabellus* también se evidencian a nivel de similitud genómica con el resto de los miembros del complejo *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus*. Mediante los métodos de **GISH** y de **DOT BLOTS** se verificará la separación de *P. coccineus* subsp. *glabellus* del resto de las especies que integran el complejo *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus*.

III. Determinar la cercanía genómica entre todos los taxa que integran al complejo *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus*: *P. coccineus* subsp. *coccineus*, *P. c.* subsp. *formosus*, *P. c.* subsp. *darwinianus*, *P. c.* subsp. *glabellus*, *P. c.* subsp. *griseus* y *P. vulgaris*, utilizando para ello la hibridación *ex situ* de **DOT BLOTS**.

HIPÓTESIS

- Si *Phaseolus coccineus* subsp. *darwinianus* (= *P. polyanthus*) es el resultado de la cruce entre *P. coccineus* y *P. vulgaris* y los genomas de estas dos últimas especies están bien diferenciados, entonces, al aplicar la

b) Utilizando poblaciones silvestres y cultivadas, determinar si *P. coccineus* subsp. *darwinianus* es una derivación directa de *P. coccineus*.

II. Determinar si las diferencias morfológicas y de ADN de cloroplastos observadas en *P. coccineus* subsp. *glabellus* también se evidencian a nivel de similitud genómica con el resto de los miembros del complejo *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus*. Mediante los métodos de **GISH** y de **DOT BLOTS** se verificará la separación de *P. coccineus* subsp. *glabellus* del resto de las especies que integran el complejo *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus*.

III. Determinar la cercanía genómica entre todos los taxa que integran al complejo *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus*: *P. coccineus* subsp. *coccineus*, *P. c.* subsp. *formosus*, *P. c.* subsp. *darwinianus*, *P. c.* subsp. *glabellus*, *P. c.* subsp. *griseus* y *P. vulgaris*, utilizando para ello la hibridación *ex situ* de **DOT BLOTS**.

HIPÓTESIS

- Si *Phaseolus coccineus* subsp. *darwinianus* (= *P. polyanthus*) es el resultado de la cruce entre *P. coccineus* y *P. vulgaris* y los genomas de estas dos últimas especies están bien diferenciados, entonces, al aplicar la

técnica de **GISH** en estos tres taxa, la mitad de los cromosomas de *P. coccineus* subsp. *darwinianus* serán marcados al hibridizarse con el ADN total de *P. coccineus*, mientras que la otra mitad deberá ser hibridizada por el ADN total de *P. vulgaris*. Si *P. coccineus* subsp. *darwinianus* es una derivación directa de *P. coccineus*, entonces todos o casi todos los cromosomas de la subsp. *darwinianus* deberán ser marcados cuando se hibridicen con el ADN total de *P. coccineus*.

- Si *Phaseolus coccineus* subsp. *glabellus* no está tan cercano genéticamente de *P. coccineus* como se desprende de los estudios taxonómicos y de ADN de cloroplastos realizados en esta subespecie, entonces con **GISH** y con **DOT BLOTS** se espera que haya poca o nula hibridación cuando sus cromosomas y ADN aislado se hibridicen con el ADN total de *P. coccineus*.
- Si las especies que integran al complejo *Phaseolus vulgaris-P. coccineus* muestran distinto grado de cercanía genética, entonces al aplicar la técnica de **DOT BLOTS** deberán obtenerse diversos grados de intensidad en la hibridación y un débil o nulo marcaje de hibridación con el ADN de *P. leptostachyus* (LEP), especie que está fuera del complejo y que es utilizada como testigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los taxa analizados en el presente estudio son integrantes del complejo *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus*, con excepción de *Phaseolus leptostachyus* que fue utilizado como especie testigo en la hibridación de **DOT BLOTS**. Los datos de recolección del material biológico se presentan en la tabla 2.

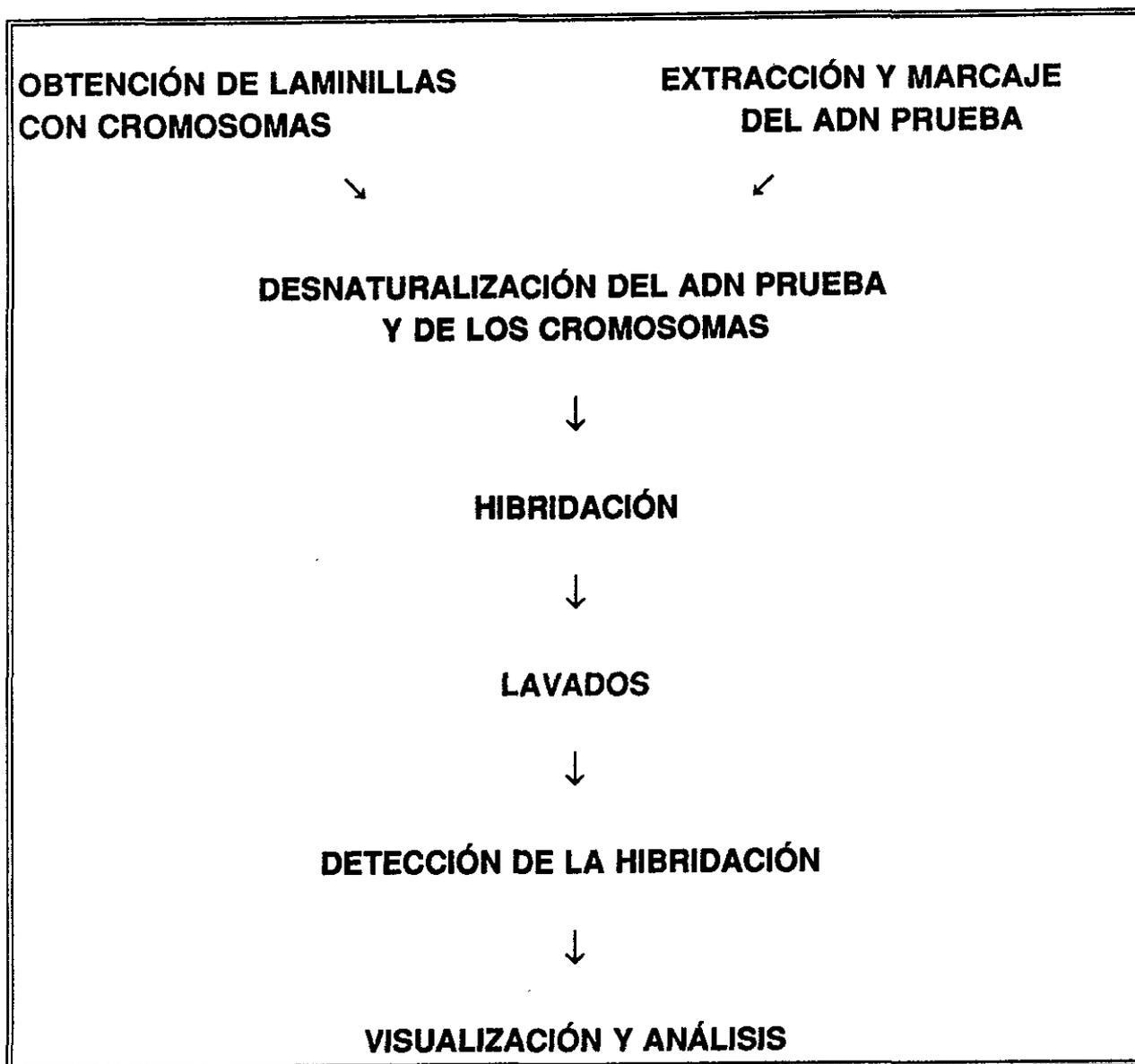
HIBRIDACIÓN GENÓMICA *IN SITU*

El método empleado para llevar a cabo la hibridación genómica *in situ* es bastante extenso. En el cuadro 1 se presenta un diagrama en donde de manera condensada, se muestra todo el procedimiento y posteriormente éste es descrito con cada uno de los pasos involucrados. La relación de reactivos y soluciones utilizados es presentado en el apéndice 1.

Tabla 2. Datos de recolección de las especies utilizadas en la Hibridación Genómica *in situ* y manchas de punto (Dot Blots).

ESPECIE	COLECTOR	LOCALIDAD	NOMBRE COMUN	ALTITUD msnm
<i>P. coccineus</i> subsp. <i>coccineus</i> cult.	F. Basurto 1275	F. Carrillo Puerto, Dgo.	Patol	2100
<i>P. coccineus</i> subsp. <i>coccineus</i> feral	J. A. Villarreal 3725	Cañón de Sn. Lorenzo, Coah.	Patol	2500
<i>P. coccineus</i> subsp. <i>formosus</i> silv.	F. Basurto 1243	San Juan, Balleza, Chih.	Patol pinto	1610
<i>P. coccineus</i> subsp. <i>formosus</i> silv.	F. Basurto s/n	Jardín Botánico, UNAM	Frijolillo	2240
<i>P. coccineus</i> subsp. <i>glabellus</i> silv.	F. Basurto 1099	Nauzontla, Pue.	Frijol de víbora	1450
<i>P. coccineus</i> subsp. <i>griseus</i> silv.	R. Ramírez-Delgadillo 2219	Barranca del Agua, Jalisco	Frijol de ratón	1800
<i>P. coccineus</i> subsp. <i>darwinianus</i> silv.	R. Ramírez-Delgadillo 2519	Barranca del Agua, Jalisco		2000
<i>P. coccineus</i> subsp. <i>darwinianus</i> cult.	D. Martínez 39	Nauzontla, Pue.	Gordo	1450
<i>P. vulgaris</i> cult.	F. Basurto 1065	Gujibechi, Bocoyna, Chih.	Rosobochame	2170
<i>P. vulgaris</i> silv.	M. Díaz Garduño s/n	Amatlán, Mor.	Tiantzinetti	
<i>P. leptostachyus</i> silv.	A. Delgado s/n	México, D. F.		2240

Cuadro 1. Pasos principales involucrados en la hibridación genómica *in situ*.



PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.- Esta parte implica la obtención de laminillas con cromosomas metafásicos y la extracción de ADN de hojas jóvenes. Incluye igualmente pasos intermedios previos al marcaje del ADN aislado.

OBTENCIÓN DE LAMINILLAS CON CROMOSOMAS METAFÁSICOS

Los cromosomas metafásicos fueron obtenidos de meristemas radiculares de semillas germinadas en cajas de petri conteniendo una capa de algodón y papel filtro humedecidos. Raíces de 1-2 cm de longitud fueron pretratadas con 8-hidroxiquinoleína 0.002M durante 5 horas, posteriormente fueron fijadas en **farmer** (mezcla de alcohol etílico absoluto-ácido acético glacial en una proporción 3:1) por una hora como mínimo; para ablandar el tejido meristemático y obtener una buena separación celular, las raíces fueron colocadas después de un lavado con agua en una solución de celulasa 2%-pectinasa 20% durante 30 min a 37°C; el aplastamiento del meristemo fue realizado en una gota de ácido acético glacial al 45%. El cubreobjetos fue removido de la preparación empleando el método de congelación descrito por Conger y Fairchild (1953). Las laminillas obtenidas fueron almacenadas hasta su utilización en cajas de preparaciones con una bolsa conteniendo gel de sílice en su interior y selladas con cinta adhesiva, para de esta forma extraer la mayor cantidad de humedad.

EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción del ADN fue de acuerdo con la técnica descrita por Doyle y Doyle (1990) con algunas modificaciones desarrolladas en el Jodrell Laboratory de los Royal Botanic Gardens, Kew. La técnica completa se describe a continuación:

- Precalear 10 ml de solución amortiguadora (buffer) de extracción y un mortero a 65°C en un baño maría.
- Cortar en trozos 0.5 a 1 gramo de hojas jóvenes de la planta, colocarlos en un mortero junto con una pequeña cantidad del amortiguador de extracción precalentado y moler bien hasta obtener una pasta, agregar más amortiguador haciendo una suspensión para finalmente utilizar el resto del amortiguador.
- Transferir la suspensión a tubos de centrífuga e incubar a 65°C por lo menos durante 20 min.
- Agregar un volumen igual (10 ml) de cloroformo-alcohol isoamílico al tubo y colocar en agitación por aproximadamente 20 min para lograr una buena emulsión.
- Centrifugar a 8000 rpm durante 10 min a 4°C.
- Colocar en un tubo limpio la fase acuosa y agregarle isopropanol frío hasta dar una concentración final de 60%. Centrifugar nuevamente a 8000 rpm durante 10 min a 4°C, remover el sobrenadante y lavar el precipitado en etanol 70% frío (20 ml).

le integra un paquete computacional, programado para hacer las mediciones de manera automática y proporcionar la concentración de ADN y de proteínas presentes en cada muestra; en caso de que la concentración de proteínas esté por arriba de la obtenida para el ADN, se requiere llevar a cabo una reextracción para disminuir las impurezas provocadas por la alta concentración de proteínas.

MARCAJE DE ADN

El método utilizado para el marcaje de ADN fue el llamado reacción de traslado por corte (nick translation), el cual emplea dos enzimas provenientes de *Escherichia coli*: ADNasa I y ADN polimerasa, para incorporar nucleótidos marcados a lo largo de la doble cadena de ADN.

Para marcar 3 microgramos de ADN, se agregaron en un tubo eppendorf las cantidades mostradas en la tabla 3.

Tabla 3. Especies de *Phaseolus* cuyo ADN fue marcado con biotín o digoxigenina.

TAXA (ADN A SER MARCADO)	CANTIDAD DE ADN (3 µg)* (µl)	10X NTB (µl)	10X DE MEZCLA dNTP SIN MARCAR (µl)	CANTIDAD DE NUCLEOTIDO MARCADO (µl)	DTT (µl)	AGUA DESTILADA (µl)	VOLUMEN TOTAL (µl)
COC	2	15	15	3	3	112	150
FOR	0.65	15	15	3	3	113.35	150
GLA	1	15	15	3	3	113	150
GRI	0.5	15	15	3	3	113.5	150
DAR	1	15	15	3	3	113	150
VUL	2.5	15	15	3	3	111.5	150

*La cantidad en microlitros que debe ser utilizada para el marcaje de ADN depende de la concentración final que se obtuvo en el proceso de extracción del mismo; de ello depende la cantidad de agua destilada a ser agregada, para un volumen final total de 150 µl.

DTT= ditionitrotol; dNTP= deoxinucleotido trifosfato; NTB= "nick translation buffer"

Las cantidades mostradas en la tabla para cada especie se colocan en ese orden en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se mezclan bien en un vórtex y se agregan 10 μ l de mezcla de enzimas (0.4U/ μ l ADN polimerasa I + 40 pg/ μ l ADNasa), para continuar con los siguientes pasos:

- Incubar 90 min a 16°C.
- Parar la reacción agregando 5 μ l de EDTA 0.5M.
- Agregar 3 μ l de ADN de esperma de salmón.
- Mezclar vigorosamente y agregar 15 μ l de acetato de sodio 3M, mezclar nuevamente y centrifugar brevemente.
- Agregar 300 μ l de etanol frío y mezclar invirtiendo varias veces el tubo.
- Dejar por lo menos 2 horas o toda la noche a -20°C.
- Centrifugar a 13 000 rpm a 4°C durante 10 min.
- Descartar el etanol y dejar boca abajo el tubo hasta que el precipitado se seque.
- Resuspender el precipitado en 150 μ l de agua, mezclar bien y dejar que se disuelva a temperatura ambiente o a 4°C durante 30 min o más.
- Agregar 15 μ l de acetato de sodio 3M, mezclar y centrifugar brevemente.
- Agregar 300 μ l de etanol frío y mezclar invirtiendo varias veces el tubo.
- Dejar a -20°C durante 2 horas como mínimo.
- Centrifugar a 13 000 rpm durante 10 min a 4°C.
- Descartar el sobrenadante y dejar el tubo con la boca hacia abajo para que el precipitado se seque.
- Agregar 21 μ l de TE pH 8, mezclar, centrifugar brevemente y dejar que el precipitado se disuelva.

PRETRATAMIENTO DE LAS LAMINILLAS CON CROMOSOMAS

Para asegurar una deshidratación total de las laminillas con los cromosomas, una vez que se extraen del congelador, se dejan secar en una incubadora a 37°C toda una noche. Una vez deshidratadas, se les agregan 200 μ l de ARNasa A diluida (1:1000) y se coloca un cubreobjetos de plástico, se incuba durante 1 h a 37°C.

Se remueve el cubreobjetos y se lavan las laminillas 3 veces en 2x SSC durante 5 min cada uno con agitación, posteriormente se colocan en solución farmer por 30 min y se deshidratan en una serie de alcoholes de 70, 90 y 100% durante 3 min cada uno y se dejan secar a temperatura ambiente hasta el momento en que se lleve a cabo la hibridación.

PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE HIBRIDACIÓN

Las cantidades que a continuación se mencionan son suficientes para llevar a cabo la hibridación en 5 laminillas.

- 10 μ l de ADN marcado
- 50 μ l de formamida
- 20 μ l de extran sulfato
- 10 μ l de 20x SSC
- 10 μ l de agua destilada

Se mezcla muy bien y se mantiene en refrigeración hasta que se lleve a cabo su desnaturalización, la cual se inicia justo antes de que los cromosomas de las dos últimas laminillas estén siendo desnaturalizados (como se describe más adelante). La desnaturalización de la mezcla de hibridación se realiza en un baño maría a 76°C durante 15 min y posteriormente se mantiene en hielo hasta que dicha mezcla es aplicada sobre las laminillas.

DESNATURALIZACIÓN DE LOS CROMOSOMAS

La desnaturalización de los cromosomas se realiza en una solución de formamida al 70% en 2xSSC a 70-72°C. Las laminillas son introducidas durante 2 min en la formamida caliente, e inmediatamente se pasan por una serie de alcoholes fríos de 50, 70, 90 y 100% durante 2 min en cada uno de ellos y se dejan secar a temperatura ambiente.

HIBRIDACIÓN

Una vez que la mezcla de hibridación y los cromosomas han sido desnaturalizados, se colocan sobre cada laminilla 20 μ l de la mezcla de hibridación. Se cubre la laminilla con un cubreobjetos de plástico evitando las burbujas y se acomodan en una cámara húmeda de la que se sellan los bordes para evitar la evaporación. Se dejan toda la noche en una incubadora a 37°C.

Las hibridaciones *in situ* que fueron realizadas son mostradas en el siguiente cuadro:

CROMOSOMAS	ADN PRUEBA MARCADO CON BIOTIN O DIGOXIGENINA					
	coc cult. F. B. 1275	VUL silv. M. D.s/n	DAR silv. R.R.2519	coc feral J.A.V.3725	FOR F.B.s/n	GLA F.B. 1099
DAR silvestre R.R. 2519	X	X				
DAR cultivado D.M. 39	X	X				
VUL cultivado F.B. 1065	X		X			
FOR silvestre F.B. s/n				X	X	
GRI silvestre R.R. 2219				X		
GLA silvestre F.B. 1099				X		X

LAVADOS POSTHIBRIDACIÓN

Colocar dos cristalizadores conteniendo 2X SSC y otro con formamida al 50% en un baño maría con agitación, permitiendo que las temperaturas se equilibren a 42°C. Se retiran las laminillas de la incubación y cuidadosamente se remueve el cubreobjetos e inmediatamente se introducen las preparaciones en uno de los cristalizadores conteniendo 2X SSC, se agita suavemente durante 5 min y se transfieren al otro cristalizador que contiene la formamida al 50 % durante 10

min con agitación, posteriormente se introducen en el tercer cristalizador con 2X SSC por otros 10 min con agitación. Se transfieren a otro cristalizador con 2X SSC a temperatura ambiente y se agita suavemente de nueva cuenta durante 10 min, transfiriendo posteriormente a otro cristalizador con solución amortiguadora de bicarbonato de sodio y Tween 20 (1X BT) durante 10 min.

DETECCIÓN DE LA HIBRIDACIÓN

Se extraen las laminillas del amortiguador 1X BT, se dejan escurrir individualmente y se les agrega a cada una de ellas 50 μ l de suero de albúmina de bovino al 5% (BSA), se les coloca un cubreobjetos plástico y se incuban a temperatura ambiente por 5 min.

Se retira el cubreobjetos, se escurre, pero sin dejar que se sequen las preparaciones se les añade 50 μ l de F-avidina en una concentración de 10 μ g/ml en el caso del ADN marcado con biotín, mientras que para el ADN marcado con digoxigenina se adicionan 50 μ l de F-antidigoxigenina. Se les coloca otro cubreobjetos limpio, se introducen a una cámara húmeda y se incuban a 37°C durante una hora. Mientras se lleva a cabo la incubación, se calientan a 40°C dos cristalizadores conteniendo amortiguador 1X BT.

Se remueve el cubreobjetos y las preparaciones son introducidas en uno de los cristalizadores conteniendo el amortiguador 1X BT a 40°C con agitación durante 5 min, se repite el proceso con el otro cristalizador.

AMPLIFICACIÓN DE LA SEÑAL DEL ADN MARCADO CON BIOTÍN

Se escurre cada preparación de manera individual y se les agrega 50 μ l de bloqueador de suero de cabra al 5%, se cubren con un cubreobjetos de plástico y se dejan incubar a temperatura ambiente por 5 min. Se retira el cubreobjetos, se escurre la preparación y se le añade 50 μ l de antiavidina con biotín a una concentración de 25 μ g/ml en bloqueador de suero de cabra. Se les coloca nuevamente un cubreobjetos y se incuban en una cámara húmeda a 37°C por 1 hora. Durante la incubación se calientan a 40°C dos cristalizadores conteniendo amortiguador 1X BT en un baño maría con agitación en los que se lavan las preparaciones durante 5 min en cada uno de ellos. Se escurren las preparaciones y se les agrega nuevamente 50 μ l de F-avidina diluida e incuban a 37°C durante otra hora, después de la cual se les dan dos lavados en amortiguador 1X BT a 40°C con agitación por 5 min cada uno.

CONTRATINCIÓN, MONTAJE Y VISUALIZACIÓN

Extraer cada preparación del amortiguador, escurrir bien y agregar 50 μ l de yoduro de propidio a una concentración de 2.5 μ g/ml y colocar un cubreobjetos para incubar en obscuridad y a temperatura ambiente durante 10 min. Retirar el cubreobjetos e inmediatamente introducir en amortiguador 1X BT durante 5 min con agitación. Escurrir cada preparación y para montar agregar 15 μ l de Vectashield/DAPI y colocar un cubreobjetos de vidrio. El exceso de medio de montaje se elimina al presionar la preparación entre dos hojas de papel filtro.

La hibridación *in situ* es visualizada en un microscopio de epifluorescencia con filtros Carl Zeiss 01 para la tinción con DAPI y un filtro 09 para observar los cromosomas teñidos con biotín y digoxigenina. Aunque el análisis microscópico puede ser de inmediato, es más conveniente mantener las preparaciones en obscuridad durante 2 días a 4°C para que la señal se estabilice. Los mejores campos fueron fotografiados utilizando película fotográfica Fuji ASA 1000. Los cromosomas de los mejores campos se fotografiaron con tinción DAPI y con biotín.

HIBRIDACIÓN DE ADN SOBRE MEMBRANA ("DOT BLOTS")

En este tipo de hibridación *ex situ*, se siguió el método descrito en el manual de instrucciones del aparato de microfiltración de los laboratorios Bio Rad, números de catálogo 170-6545 y 170-6547, y también siguiendo las especificaciones del protocolo del rediprime para marcado de ADN de los laboratorios Amersham International (apéndice 2).

COLOCACIÓN DEL ADN EN MEMBRANA HYBOND N+

El ADN genómico total de COC, FOR, GRI, GLA, DAR, VUL y LEP (éste último como testigo) fue aislado de la misma manera descrita previamente para **GISH**.

Para cada especie se prepararon diluciones de 800, 160, 32, 6.4 y 1.28 ng. El ADN diluido fue desnaturalizado por calor a 100°C durante 10 min. Una vez desnaturalizado el ADN de las distintas diluciones, se colocaron brevemente en hielo, sólo para ser transferido al aparato de **DOT BLOTS** y dejarlo atrapado en la membrana de nitrocelulosa en su forma desnaturalizada (el modo de ser colocada cada una de las diluciones es descrito en el apéndice correspondiente al aparato de microfiltración). El ordenamiento de las diluciones es mostrado en la tabla 4.

Tabla 4. Especies que fueron empleadas en la hibridación **Dot Blots** y las concentraciones utilizadas. En el caso de *P. vulgaris*, *P. coccineus* subsp. *coccineus* y de *P. coccineus* subsp. *darwinianus* se usaron una población silvestre (1) y una cultivada (2). El ADN que fue marcado con P³² y que fue utilizado como prueba correspondió a *P. coccineus* subsp. *coccineus* con número de colecta 1275 de F. Basurto proveniente de Durango, México.

ADN (conc.)	TAXA									
	GLA	GRI	FOR	coc 1	coc 2	VUL 1	VUL 2	DAR 1	DAR 2	LEP
800 ng	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
160 ng	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
32 ng	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
6.4 ng	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1.28 ng	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

PREHIBRIDACIÓN

La membrana de nitrocelulosa fue retirada del aparato de microfiltración e introducida en una bolsa de plástico a la cual se le agregaron 20 ml de la mezcla de prehibridación consistente en sulfato de extran al 5%, solución de Denhart 5x, 0.4% N-lauroyl sarcosina y 100 µl de ADN desnaturalizado de testículo de salmón, se selló la bolsa e incubó a 65°C durante toda la noche con agitación de 50 rpm.

HIBRIDACIÓN, LAVADO Y DETECCIÓN DE LOS DOT BLOTS

Antes de retirar la membrana de la incubadora, siguiendo el sistema de "random prime DNA", se marcaron con P^{32} (fósforo radiactivo), 50 ng de ADN de coc (*F. Basurto* 1275) que se diluyeron en 21 μ l de TE y desnaturalizaron por calor durante 2 min. El ADN marcado fue agregado a la bolsa que contenía la membrana, se eliminaron todas las burbujas y la bolsa se selló de nueva cuenta. La membrana fue puesta nuevamente en incubación a 65°C con agitación durante toda la noche.

Al día siguiente se realizaron los lavados posthibridación, los cuales son altamente agresivos y que consisten en:

Lavado en 2xSSC, SDS 0.1% durante 30 min a 65°C.

Lavado en 1xSSC, SDS 0.1% durante 30 min a 65°C.

Lavado en 0.1xSSC, SDS 0.1 durante 30 min a 65°C.

Lavado en 0.1xSSC, SDS 0.1% durante 15 min a 65°C.

Durante cada lavado se determina la cantidad de radiactividad que tiene la membrana, como se detectó una baja considerable de la misma antes de que se completaran todos los lavados, se pasó la membrana a un lavado final en 2xSSC, se envolvió en un plástico para ponerla en contacto con película fotográfica Omax-X de Kodak a -80°C durante 15 horas para de esta forma detectar la intensidad de la hibridación en las distintas concentraciones de las especies analizadas. La

película fue revelada y se imprimió para detectar la hibridación en cada una de las muestras. La similitud genética fue determinada cualitativa y cuantitativamente por la intensidad de color y diámetro de la mancha respectivamente en el papel fotográfico.

Para la obtención del dendograma de análisis de distancia de similitud, producto de los **DOT BLOT**, se utilizó el programa NTSYS-pc versión 1.80 (Rohlf, 1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del aislamiento del ADN genómico de los distintos taxa incluidos en el estudio, se obtuvieron las siguientes concentraciones:

TAXA	EJEMPLARES	CONC. ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
COC*●	<i>F. Basurto 1275</i> cult.	1.8
COC●	<i>F. Basurto 1243</i> silv.	2.0
COC*	<i>J. A. Villarreal 3725</i> feral	1.4
FOR*●	<i>F. Basurto s/n</i> silv.	4.74
GLA*●	<i>F. Basurto 1099</i> silv.	3.03
GRI●	<i>R. Ramírez-Delgadillo 2219</i> silv.	9.0
DAR*●	<i>R. Ramírez-Delgadillo 2519</i> silv.	4.1
DAR●	<i>D. Martínez 39</i> cult.	8.9
VUL*●	<i>M. Díaz Garduño s/n</i> silv.	1.3
VUL●	<i>F. Basurto 1065</i> cult.	5.5
LEP●	<i>A. Delgado s/n</i> silv.	0.61

Parte del ADN aislado de las especies señaladas con un asterisco (*) fue marcado con biotín o digoxigenina en la hibridación genómica *in situ* (GISH), mientras que todas las especies marcadas con un círculo obscuro (●) fueron utilizadas en la hibridación *ex situ* (DOT BLOTS).

Puede apreciarse en los resultados anteriores, que las concentraciones de ADN obtenidas, aunque variables fueron altas, es por ello que los volúmenes necesarios para marcar 3 μg de ADN fueron en algunos casos menores a un microlitro. GRI fue la especie de la que se obtuvo una mayor concentración por microlitro (9 μg) y LEP en la que se logró una menor concentración (0.61 μg). Las distintas cantidades de ADN obtenidas para las diferentes especies puede estar reflejando que la trituración de las hojas no fue homogénea para todas, o bien que el tejido foliar presenta distinta dureza en cada una de las especies, por lo que el aislamiento del ADN tuvo mayor rendimiento en algunas especies que en otras.

HIBRIDACIÓN GENÓMICA *in situ*

Una vez realizado el aislamiento, marcaje y detección de la incorporación del biotín o digoxigenina en el ADN, se llevaron a cabo las hibridaciones cuyos resultados se presentan a continuación:

■ *Phaseolus coccineus* subsp. *darwinianus* cultivado (cromosomas) X *P. coccineus* subsp. *coccineus* cultivado (ADN)

Cuando se realizó la hibridación entre los cromosomas de *DAR* (cultivado) con el ADN marcado de *COC* (cultivado) se obtuvo una hibridación casi total, como se muestra en la figura 1. La homología entre regiones del ADN-prueba con el de los cromosomas en las laminillas, se detecta porque los cromosomas adquieren

una coloración verde-amarilla, resultado de la incorporación de nucleótidos marcados con digoxigenina unida a la antidigoxigenina cuando se lleva a cabo la renaturalización del ADN de los cromosomas en presencia del ADN aislado y marcado, también desnaturalizado. La incorporación se detectó durante la observación en microscopio de fluorescencia. La carencia de homología entre dos genomas se aprecia como una coloración roja, producida por la incorporación del yoduro de propidio en segmentos o regiones en que no se incorporó la digoxigenina o el biotín y por lo tanto, esto está implicando que no hubo reconocimiento.

El llevarse a cabo una hibridación cercana a la totalidad como la que se presenta en la figura 1, indica una muy fuerte similitud génica entre ambas subespecies, y debido a esta similitud no hay una discriminación cuando se lleva a cabo la renaturalización entre los nucleótidos marcados del ADN-prueba, con los no marcados de los cromosomas, a diferencia de lo observado en *Commelina* (Parokonny *et al.*, 1992), *Lathyrus* (Callimassia *et al.*, 1994), *Milium* (Bennett *et al.*, 1992) o en *Nicotiana* (Parokonny y Kenton, 1995), en donde se observaron cromosomas completos sin hibridar. Una observación más detallada de los cromosomas permite detectar que la coloración verde-amarilla no es del todo uniforme, indicando así que existe falta de homología génica a niveles puntuales o de pequeñas regiones cromosómicas; es posible apreciar también que en

algunas áreas la tinción es más intensa que en otras, lo cual está implicando que la similitud génica en dichas regiones es aún mayor que en las de tinción más tenue.

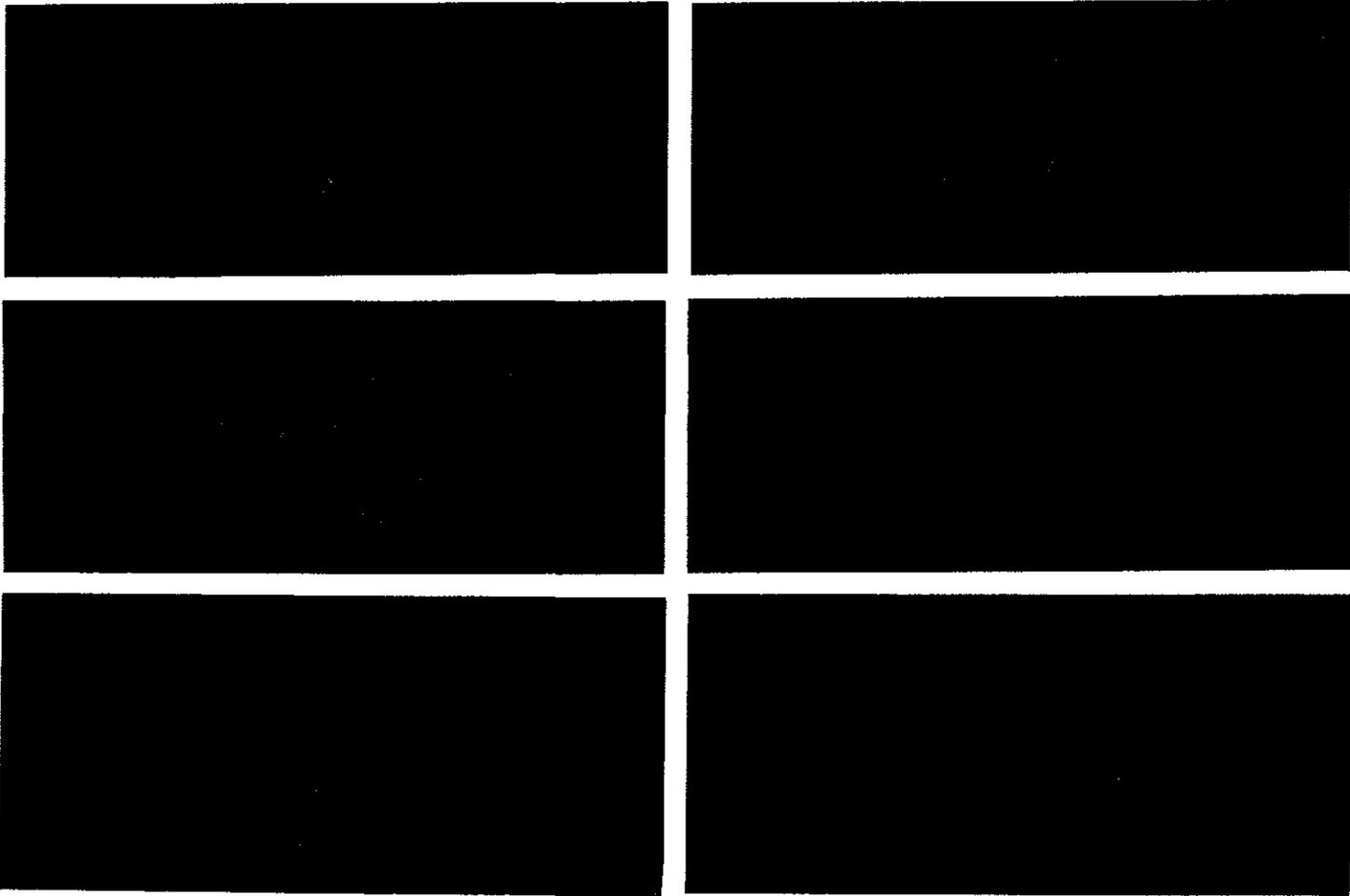


Figura 1. Cromosomas metafásicos de *Phaseolus coccineus* subsp. *darwinianus* población cultivada (D. Martínez 39). Los cromosomas de las fotografías de la izquierda están teñidos con DAPI para mostrar número y disposición. Los cromosomas de la derecha son los mismos campos, pero hibridados con el ADN genómico total de *Phaseolus coccineus coccineus* población cultivada (F. Basurto 1275) marcado con digoxigenina. La tinción verde-amarilla que presentan todos los cromosomas, indica que se llevó a cabo la hibridación en todos los cromosomas.

■ *Phaseolus coccineus* subsp. *darwinianus* silvestre (cromosomas) x *P. coccineus* subsp. *coccineus* cultivado (ADN)

En la figura 2 se observan los cromosomas de DAR de origen silvestre en donde se presenta una situación idéntica a la de la figura 1, es decir, el reconocimiento entre los dos genomas es casi total, e igualmente se presentan regiones en donde se evidencia una mayor homología que en otra.

La similitud en los resultados obtenidos entre poblaciones cultivadas y silvestres de DAR cuando se hibridan *in situ* con COC cultivado, está indicando la gran similitud génica que existe entre DAR y COC; adicionalmente también está implicando que las diferencias fenotípicas que existen y que distinguen a las poblaciones silvestres y cultivadas de DAR con COC no pueden ser detectadas con la hibridación genómica *in situ*, ya que las variaciones genéticas que están dando como resultado un fenotipo distinto, pueden ser de segmentos cromosómicos de longitud muy pequeña, mutaciones puntuales o bien, rearrreglos intracromosómicos que no pueden ser detectados con esta técnica.

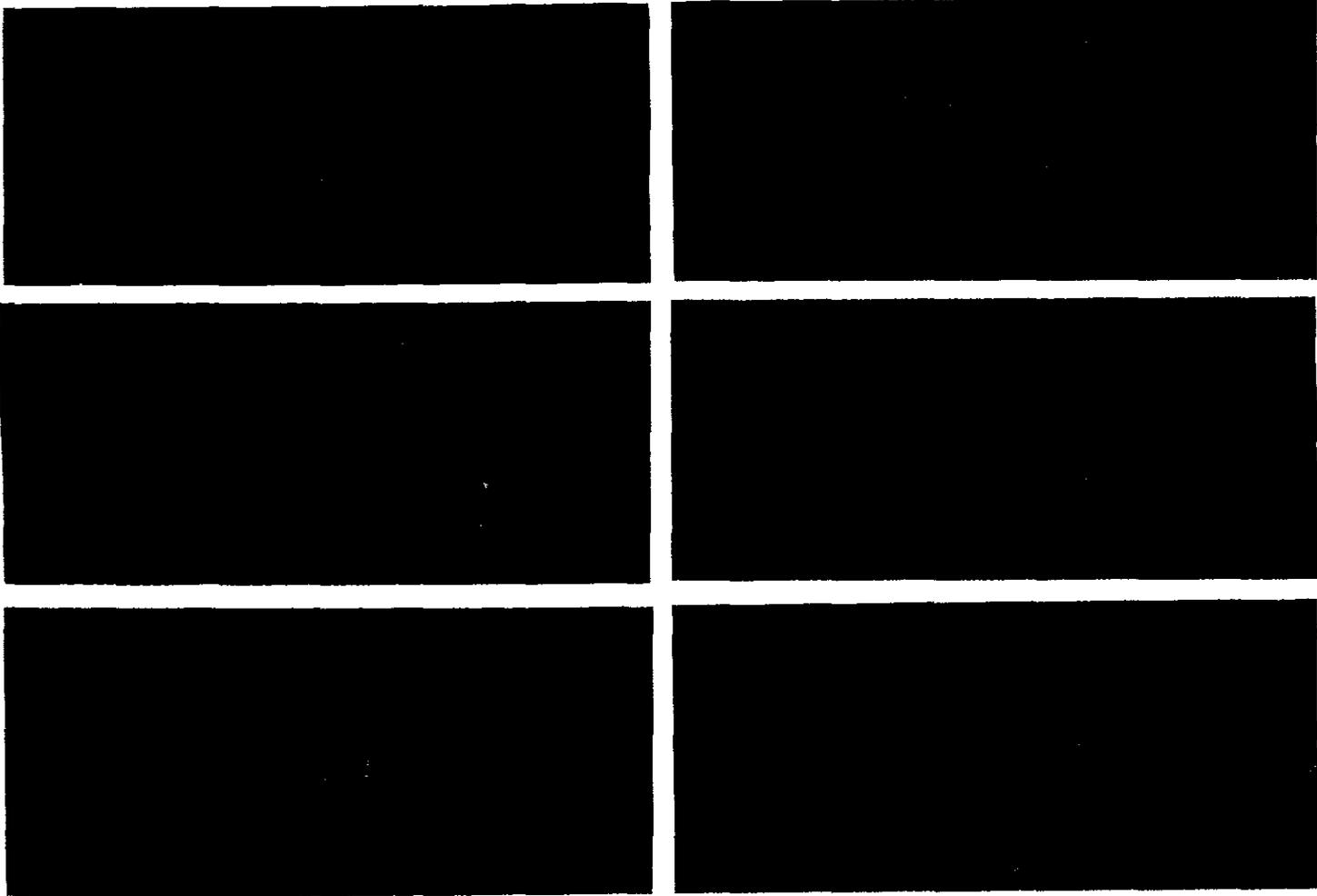


Figura 2. Cromosomas metafásicos de *Phaseolus coccineus* subsp. *darwinianus* población silvestre (*R. Ramírez-Delgadillo 2519*). Las fotografías del lado derecho muestran la hibridación con el ADN genómico total de *P. coccineus coccineus* población cultivada (*F. Basurto 1275*) el ADN fue marcado con digoxigenina. El grado de hibridación fue casi total como es apreciado por la coloración verde-amarilla que adquirieron todos los cromosomas. Las fotografías de la izquierda muestran los mismos cromosomas teñidos con DAPI.

■ ***Phaseolus coccineus* subsp. *darwinianus* cultivado (cromosomas) x *P. vulgaris* silvestre (ADN)**

No obstante que en esta hibridación es el ADN de VUL el que se está mezclando con el ADN contenido en los cromosomas de DAR, la figura 3 presenta células muy semejantes a las obtenidas cuando se realizaron las hibridaciones de DAR x COC, indicando que existe también una alta similitud génica entre VUL silvestre con las poblaciones cultivadas de DAR y por consecuencia de igual forma con COC. Por el parecido en la hibridación mostrada en los cromosomas, es difícil decir si COC o VUL es la que está más relacionada con DAR.

■ ***Phaseolus coccineus* subsp. *darwinianus* silvestre (cromosomas) x *P. vulgaris* silvestre (ADN)**

En la figura 4, a diferencia de las anteriores, se observa que varios cromosomas de DAR no se hibridaron con el ADN de VUL silvestre, los cromosomas que no muestran señales de hibridación fueron de tres a cuatro por célula. Lo anterior está indicando una menor relación de VUL silvestre con DAR silvestre; sin embargo, sigue siendo alta la similitud génica ya que más de la mitad de los cromosomas restantes incorporaron el ADN marcado con biotín. En caso de que existiera un origen híbrido para DAR y una mayor diferenciación génica

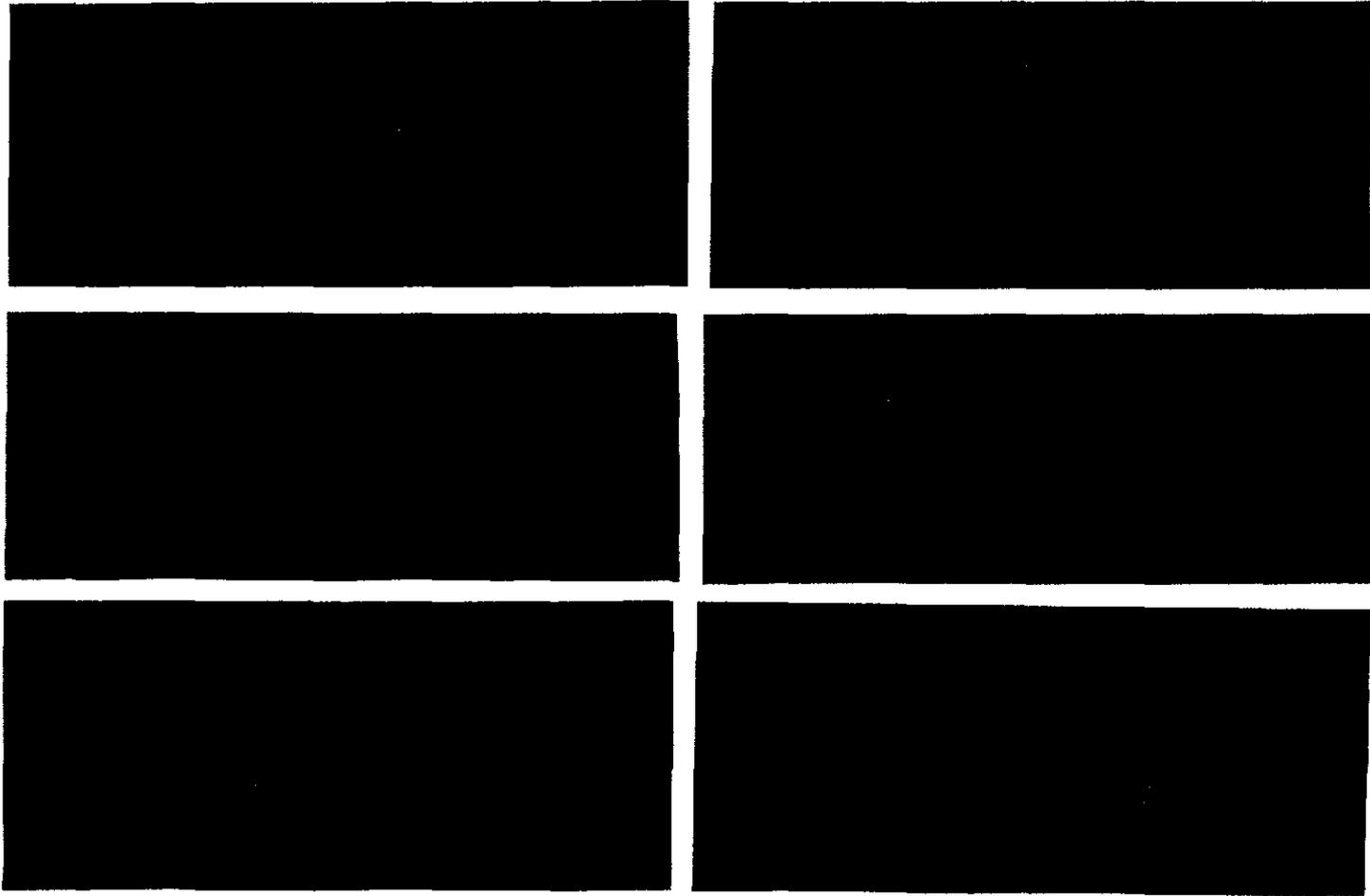


Figura 3. Cromosomas de *Phaseolus coccineus* subsp. *darwinianus* población cultivada (D. Martínez 39) hibridados con el ADN genómico total de *P. vulgaris* población silvestre (M. Martínez s/n) proveniente de Morelos y que son mostrados en las fotografías del lado derecho. La incorporación de los nucleótidos marcados con digoxigenina está indicando una alta homología genética.

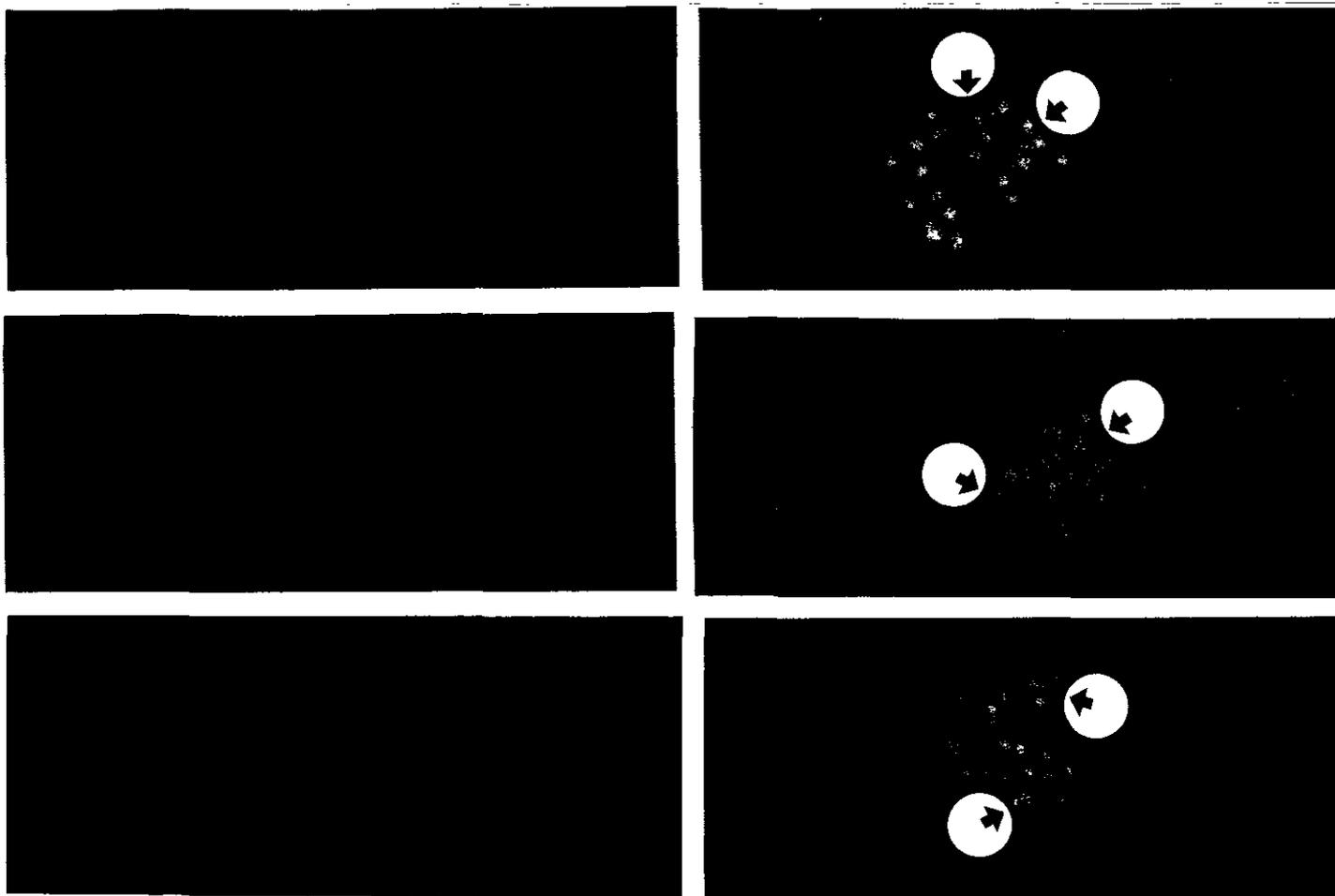


Figura 4. Cromosomas de *Phaseolus coccineus* subsp. *darwinianus* población silvestre (*R. Ramírez-Delgadillo 2519*). Los cromosomas del lado izquierdo fueron teñidos con DAPI mientras que los mismos campos fueron hibridados con el ADN genómico total marcado con digoxigenina de *P. vulgaris* población silvestre de Morelos (*M. Martínez s/n*). Las flechas señalan los cromosomas o partes de ellos que no se hibridaron mientras que el resto de ellos muestra un alto grado de hibridación.

entre COC y VUL, como fue planteado en una de las hipótesis del presente trabajo, deberían de hibridarse la mitad o casi la mitad de los cromosomas de DAR con el ADN de los progenitores propuestos por Hernández X. *et al.* (1959).

■ ***Phaseolus vulgaris* cultivado (cromosomas) x *P. coccineus* subsp. *darwinianus* silvestre (ADN)**

En este caso, al utilizar cromosomas de VUL. y ADN de DAR marcado con digoxigenina los resultados obtenidos fueron muy similares a los descritos previamente en las tres primeras hibridaciones, en el sentido de que todos los cromosomas mostraron una hibridación prácticamente total (figura 5).

■ ***Phaseolus vulgaris* cultivado (cromosomas) x *P. coccineus* cultivado (ADN)**

Se llevó a cabo esta hibridación para tratar de confirmar la alta similitud génica existente entre estas dos especies, ya manifestada con las hibridaciones genómicas descritas en los párrafos anteriores, así como en las hibridaciones interespecíficas tradicionales reportadas por otros autores (Maréchal, 1971; Hucl y Scoles, 1985), quienes documentan la formación de 10 bivalentes y dos univalentes con un promedio de 1.6 quiasmas por bivalente en las células madres del polen, evidenciando así la alta homología cromosómica y génica existente entre estos dos taxa.

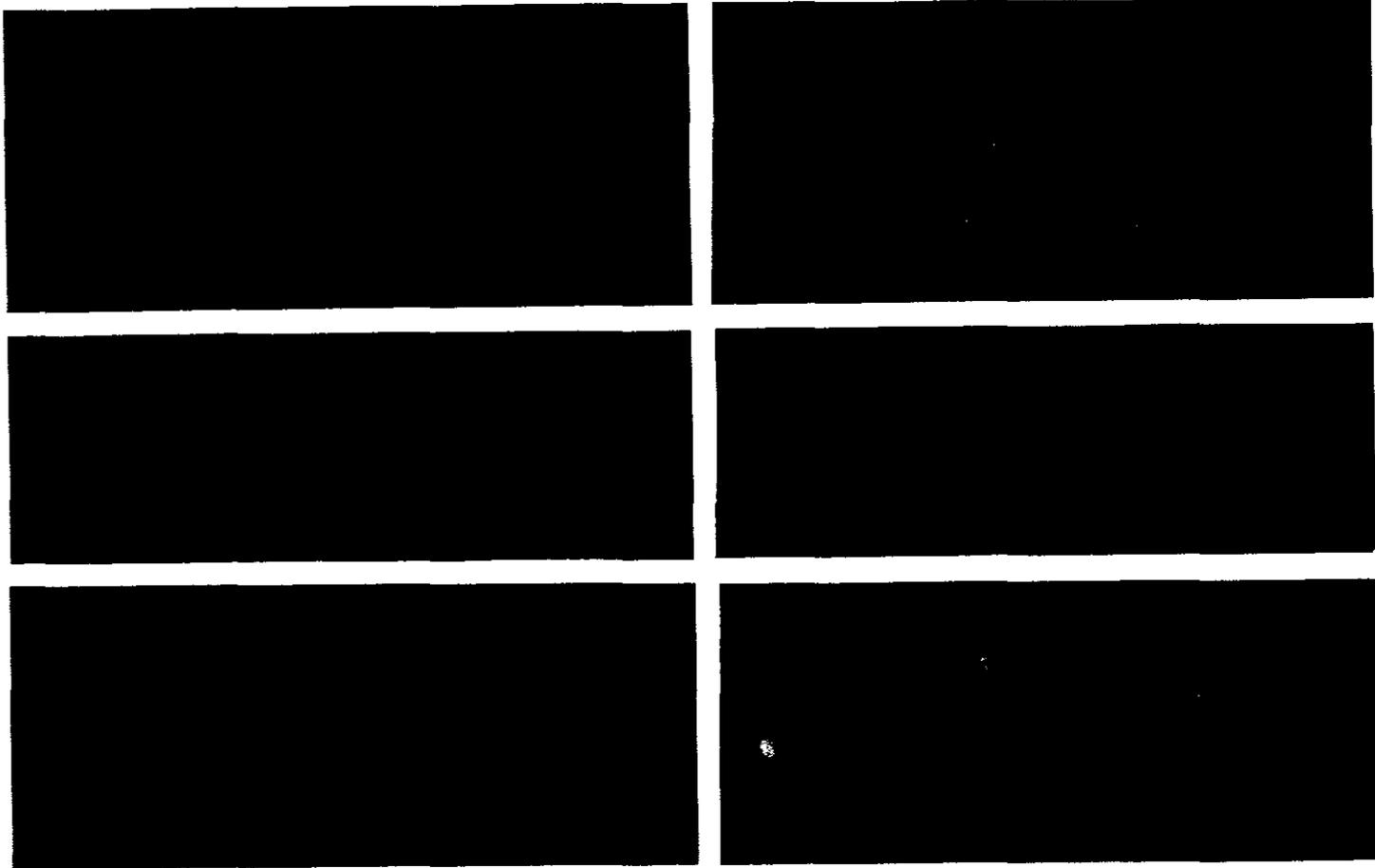


Figura 5. Cromosomas de *P. vulgaris* población cultivada (*F. Basurto 1065*). Cromosomas de la izquierda teñidos con DAPI y los de la derecha hibridados con ADN genómico total de *P. coccineus* subsp. *darwinianus* marcado con digoxigenina. Se aprecia que la hibridación se acerca al 100%.

Es importante señalar, con referencia al párrafo anterior, que Hernández X. *et al.* (1959) encontraron la misma frecuencia de bivalentes y univalentes cuando analizaron poblaciones híbridas que ellos consideraron eran el resultado de la cruce entre *Phaseolus vulgaris* x *P. coccineus*.

Los resultados que se han obtenido con distintos métodos empleados confirman que la similitud entre estos dos taxa no sólo es posible observarla a nivel de homología cromosómica y formación de quiasmas, sino que la homología en la secuencia del ADN también es muy alta como se aprecia en la figura 6.

De acuerdo con los resultados de las hibridaciones genómicas hasta ahora descritas, se aprecia que el alto grado de homología existente entre las distintas especies, subespecies y poblaciones analizadas tratando de resolver el problema del origen de DAR, impide establecer, si DAR es el resultado de la cruce entre COC y VUL, ya que en ambos casos se presentó prácticamente el mismo porcentaje de homología en todos los cromosomas, implicando que la relación o la distancia genética con ambas especies es casi la misma. Por otro lado, también está imposibilitando determinar si DAR es una derivación directa de COC; de acuerdo con el grado de realineación que se presenta entre los distintos ADN que fueron analizados, DAR podría haber surgido como derivación directa de COC o de VUL. Sin embargo, el alto grado de homología que se presenta entre los tres taxa, igualmente puede estar implicando un ancestro común, tal como ha sido planteado

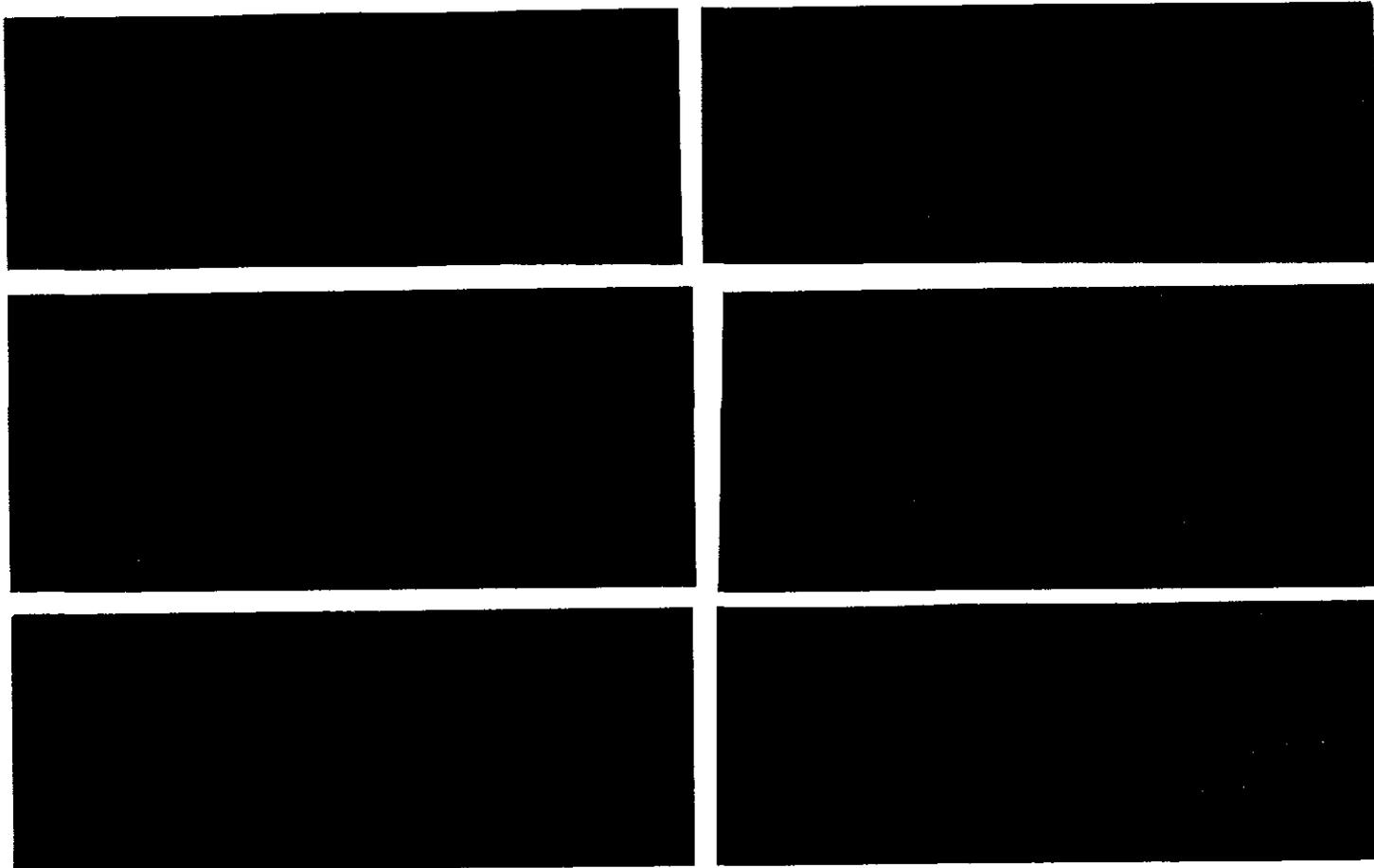


Figura 6. Cromosomas metafásicos de *Phaseolus vulgaris* población cultivada (*F. Basurto 1065*). Las fotografías de la izquierda muestran cromosomas teñidos con DAPI. Derecha, cromosomas hibridados con el ADN genómico total de *P. coccineus coccineus* población cultivada (*F. Basurto 1275*) marcado con digoxigenina. Todos los cromosomas muestran un alto porcentaje de hibridación.

por Smartt (1973) y Debouck (1991); no obstante, la diferenciación génica que han sufrido los tres taxa y que ha determinado sus características fenotípicas y fisiológicas son mínimas (o al menos eso indican los resultados), lo que permite un reconocimiento casi total al hibridarse los distintos genomas.

Es conveniente recordar que fenotípicamente (Delgado-Salinas, 1985) y a nivel de isoenzimas (Piñero y Eguiarte, 1988), existe una mayor semejanza de DAR con COC, caracteres que pueden estar determinados por pequeños rearrreglos cromosómicos y/o cambios puntuales y que no es posible detectar con la técnica empleada. Aunque dichos caracteres fenotípicos pueden ser heredados por la vía paterna o la materna, en el caso particular de DAR, se le atribuye que los adquirió por vía paterna de COC o a través de una mayor retrocruza con esta misma especie (para quienes aceptan la teoría del origen híbrido). En el análisis del ADN de cloroplastos realizado por Llaca *et al.* (1994), se encontró que DAR está más relacionado con VUL al presentar únicamente 3 cambios con las enzimas de restricción utilizadas, mientras que con COC se notó una diferencia de 13 cambios; resultados similares, señalan estos autores, fueron también descritos por Schmit (1992). En virtud de que el ADN de cloroplastos es heredado por vía materna, es lógico pensar que en el caso de DAR fue heredado de VUL o una especie muy cercana, mientras que las características fenotípicas fueron heredadas de COC o también en este caso, de una especie cercana.

Uno de los resultados de la hibridación genómica *in situ* que llama la atención, es el de la cruce entre DAR silvestre y VUL silvestre, ya que fue el único caso en que varios cromosomas no se hibridaron con el ADN-prueba. Una posible explicación puede ser que tal vez las poblaciones silvestres de VUL han quedado aisladas del resto de las poblaciones, acumulando así una serie de cambios cromosómicos factibles de detectarse con la aplicación de GISH. La diferenciación que se aprecia entre las poblaciones silvestres de DAR con las silvestres de VUL puede estar reflejando que, una vez formado el híbrido, éste fue seleccionado por los indígenas por algunas características que lo hacían atractivo, como pudieron ser el tamaño de la semilla, época de obtención del grano y sabor del mismo. Dicha selección humana provocó su aislamiento del resto de las poblaciones de VUL y DAR silvestres, pero fomentó, por el otro lado, la cruce y retrocruza con las poblaciones cultivadas de VUL y COC, principalmente con ésta última, razón por la que adquirió mayor similitud fenotípica con ella.

Si lo antes expuesto es cierto, y considerando que existe mayor dificultad para el flujo genético del híbrido con VUL silvestre por la ausencia de este último de las áreas donde se cultiva el híbrido (Miranda, 1967), o por barreras reproductoras pre o poscigótica, se explicaría por qué existe mayor diferencia génica entre VUL silvestre con las poblaciones silvestres de DAR. De acuerdo con los objetivos y las hipótesis planteadas en lo referente al problema de origen de

DAR, la utilización de la hibridación genómica *in situ* no permite resolver dicho problema. La primera hipótesis sugería un origen híbrido de DAR cuyos progenitores se proponen como COC x VUL (Hernández X. *et al.*, 1959) y por lo mismo se esperaba que sólo la mitad de los cromosomas se hibridaran con cada uno de los supuestos progenitores, tal como ha sido registrado para otras especies como *Milium montianum* y *M. vernale* (Bennett *et al.*, 1992). La otra hipótesis planteaba que el origen de DAR es una derivación directa de COC; en esta situación los resultados esperados consistían en una hibridación total o casi total cuando se pusieran en contacto los dos genomas y que hubiera muy poca homología con el ADN de VUL. Si bien es cierto que sí existió una hibridación casi total, también ocurrió un reconocimiento similar cuando se hibridó DAR con VUL cultivado.

Aunque no se puede decir con precisión el porcentaje de homología entre los genomas nucleares de DAR, COC y VUL, si es posible mencionar que éste se encuentra por arriba del 80%, porcentaje mínimo de homología señalado por Schwarzacher *et al.* (1989) para que se realice la hibridación entre secuencias de nucleótidos que muestran similitud.

■ *Phaseolus coccineus* subsp. *formosus* (cromosomas) x *P. coccineus* (ADN)

La figura 7 muestra los cromosomas de FOR hibridados con el ADN de una población feral de COC y en todos ellos se puede apreciar claramente la intensa tinción que se llevó a cabo, lo cual indica el alto grado de homología entre los dos genomas. Sin embargo, en algunos cromosomas se apreció una tinción más tenue que en el resto del complemento cromosómico; esta debilidad en la hibridación está indicando las regiones no homólogas, y que posiblemente son las que, en última instancia, se traducen en las diferencias morfológicas que permiten distinguir fenotípicamente a FOR como una subespecie de COC.

■ *Phaseolus coccineus* subsp *griseus*. (cromosomas) x *P. coccineus* (ADN)

Los cromosomas de GRI mostrados en la figura 8 se caracterizan por presentar una fuerte hibridación, y al igual que con FOR también, es posible detectar regiones cromosómicas con menor intensidad en la hibridación, aunque en este caso son más los cromosomas los que casi en su totalidad no muestran hibridación; lo anterior, de acuerdo con la técnica, está indicando que existe una diferenciación genética mayor de GRI con COC comparada con la que se encontró entre COC con FOR; aunque también esta falta de hibridación en algunos cromosomas o segmentos cromosómicos es lo que a futuro probablemente llevará a un aislamiento reproductivo entre las subespecies, lo que de acuerdo con Grant

(1981) con el tiempo este aislamiento genético y la acumulación de un mayor número de mutaciones, dará origen a nuevas especies.

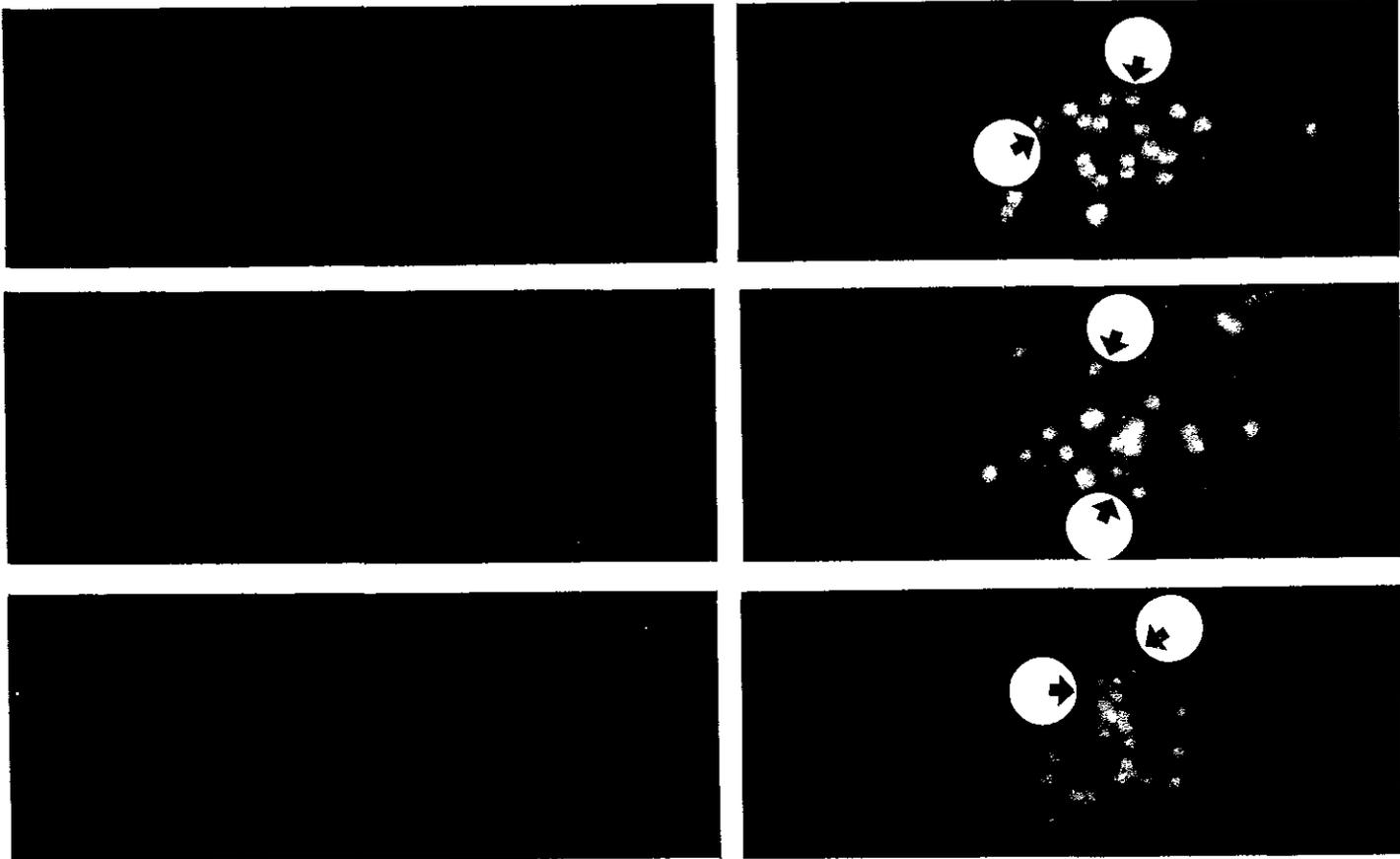


Figura 7. Cromosomas de *Phaseolus coccineus* subsp. *formosus*. Cromosomas de la izquierda teñidos con DAPI para apreciar tamaño y disposición. Derecha, cromosomas hibridados con el ADN genómico total de *P. coccineus coccineus* marcado con biotín. Nótese la intensidad de la hibridación. Las flechas señalan regiones cromosómicas con una tinción más débil.

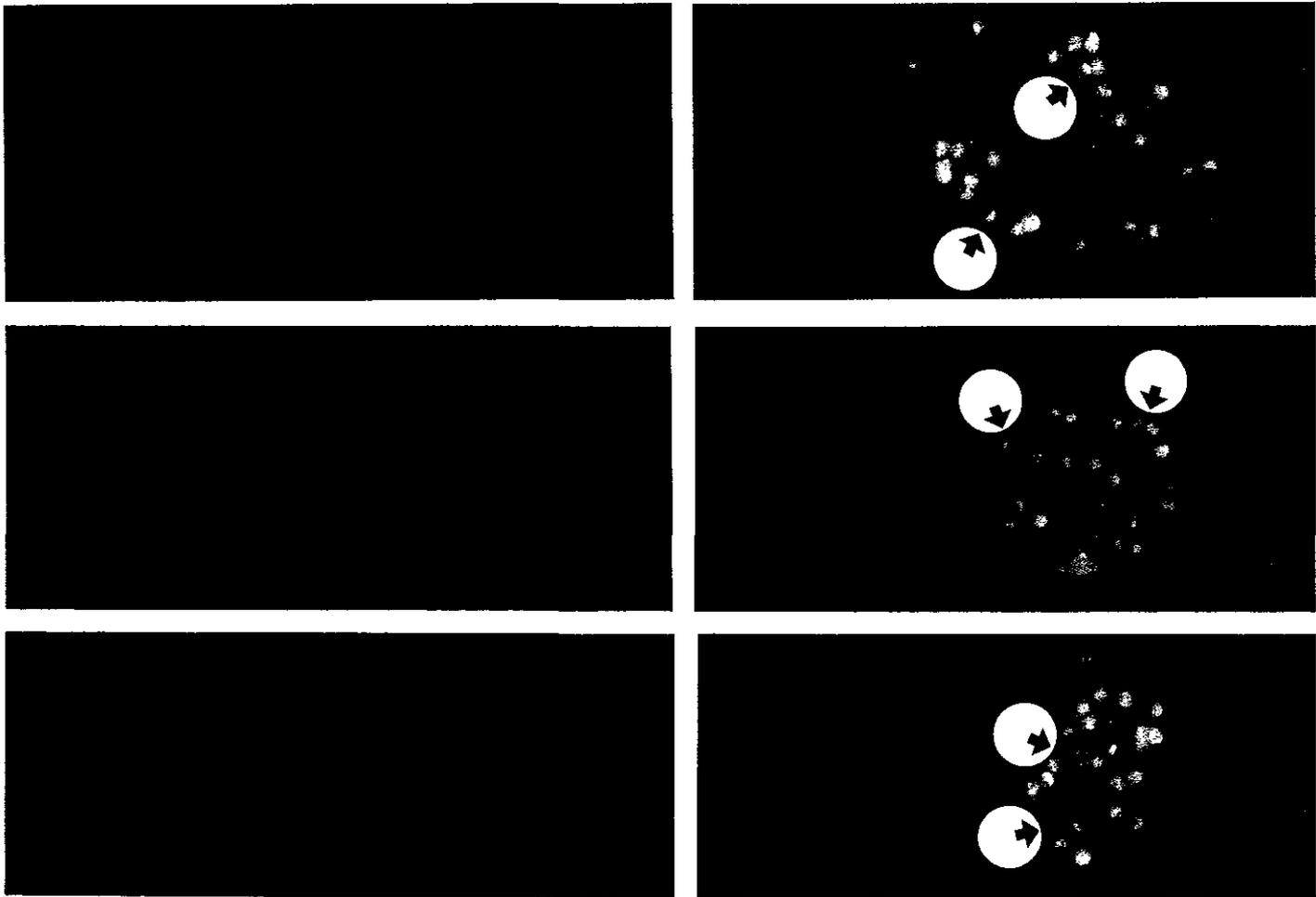


Figura 8. Cromosomas de *Phaseolus coccineus* subsp. *griseus* hibridados con el ADN genómico total de *P. coccineus coccineus* marcado con biotín. Aunque se aprecia una alta hibridación en los cromosomas de la derecha, ésta no fue tan intensa como en *P. coccineus* subsp. *griseus*. Las flechas señalan las regiones cromosómicas que no mostraron hibridación.

■ *Phaseolus coccineus* subsp. *glabellus* (cromosomas) x *P. coccineus* (ADN)

El resultado obtenido al llevar a cabo esta hibridación fue muy interesante y muy contrastante con el obtenido con las dos subespecies anteriores. La homología genética en este caso fue mucho menor que con las otras subespecies integrantes del complejo *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus*. En la figura 9 aunque se observa que existió hibridación en todos los cromosomas, la tinción y, en consecuencia la hibridación, fue débil en comparación con la mostrada en las subespecies FOR y GRI, siendo sólo dos regiones las que se tiñeron más intensamente y por lo tanto son secuencias en las que se está presentando una homología tal vez cercana al 100%. La región cromosómica con la hibridación más intensa que se aprecia en la figura 9, y por comparación, puede estar representando la región correspondiente al ADN ribosómico, la cual ha sido observada con anterioridad en los estudios con **GISH** en el género *Gibasis* (Parakony *et al.*,1992) al hibridar el ADN genómico de *Gibasis consobrina* con ρT_a71 , que corresponde a una secuencia clonada de ADN que contiene las fracciones 18S y 25S del ADNr del trigo y que en *G. consobrina* se presentan en la región telomérica de un par cromosómico; sin embargo en el caso particular de GLA es necesario la hibridación genómica con la secuencia de ρT_a71 para confirmar que corresponde a dicha secuencia.

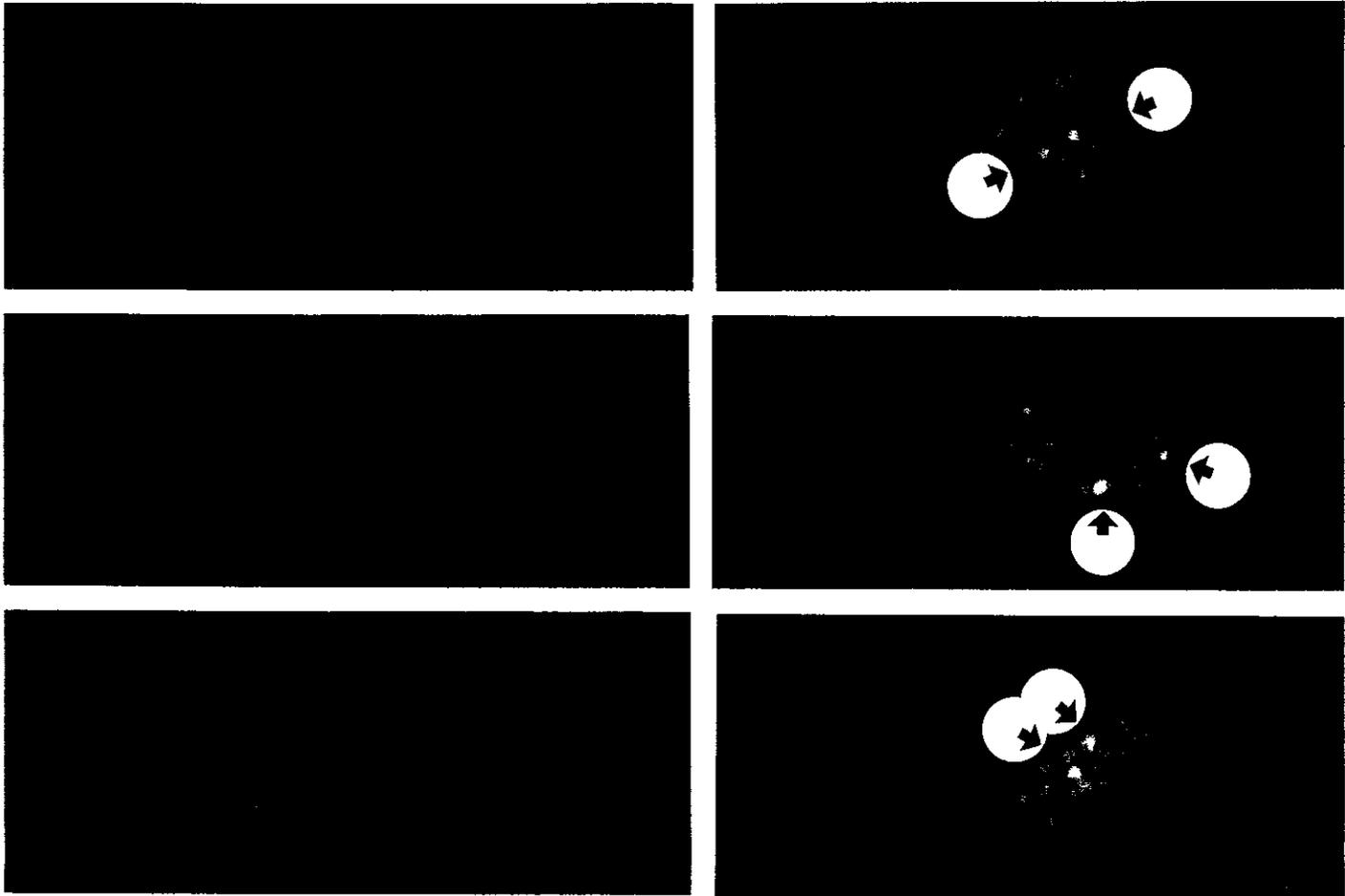


Figura 9. Cromosomas de *Phaseolus coccineus* subsp. *glabellus* hibridados con el ADN genómico total de *P. coccineus coccineus* marcado con biotín. Se aprecia que solo dos regiones cromosómicas mostraron una intensa hibridación, mientras que el resto del complemento cromosómico presentó una muy débil hibridación. Las flechas indican las regiones en donde hubo hibridación.

La menor similitud entre GLA y COC también fue percibida por Llaca *et al.* (1994) en los estudios que realizaron en ADN de cloroplastos. Estos autores documentan resultados similares al presente estudio, en el sentido de que esta subespecie es la que se encuentra menos relacionada con el resto de especies y subespecies que integran al complejo *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus*.

Con la finalidad de tener un testigo que mostrara que la hibridación genómica *in situ* se realizó de manera adecuada, se llevó a cabo la hibridación entre el genoma aislado y marcado con cromosomas pertenecientes al mismo taxon provenientes de la misma población. La figura 10a y 10b muestran los cromosomas de FOR y GLA respectivamente, hibridados con su propio genoma marcado con biotín y es evidente la hibridación total de los cromosomas con el ADN propio de cada taxon, confirmándose de este modo la efectividad de la técnica empleada.

Los resultados con la hibridación genómica *in situ* en las especies y subespecies que integran al complejo *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus*, apoyan el planteamiento de Llaca *et al.* (1994) y Schmit *et al.* (1996) quienes, con base en sus resultados con el ADN de cloroplastos, proponen que GLA debe ser considerada una especie independiente de COC. Otras diferencias, como son las bractéolas pequeñas y glabras (Delgado-Salinas, 1985), estructura y morfología de la semilla (Maréchal *et al.* 1978), la ausencia de hibridación natural y artificial

con miembros del complejo *Phaseolus vulgaris*- *P. coccineus* (Delgado-Salinas, 1985; Schmit *et al.*, 1991) y al patrón de bandas desplegado con el análisis de electroforesis de proteínas que indican la carencia de faseolina en GLA (Schmit y Debouck, 1990; Schmit *et al.*, 1991) ya habían sido señaladas y apuntaban que la relación entre GLA con COC, no era tan estrecha como lo es con el resto de los taxa integrantes del complejo, al grado que los resultados obtenidos por diferentes vías sugieren que el estatus específico otorgado a GLA por Piper en 1926 (Schmit *et al.*, 1991) debe ser reafirmado.



Figura 10. a) Cromosomas de *Phaseolus coccineus* subsp. *formosus* hibridados con su propio ADN genómico total marcado con biotín. b) cromosomas de *Phaseolus coccineus* subsp. *glabellus* hibridados con su propio ADN genómico, también marcado con biotín. En ambos casos se aprecia la intensa hibridación que se llevó a cabo como era de esperarse, ya que la homología es del 100%.

Los resultados obtenidos en el presente estudio con la hibridación genómica *in situ* están indicando que los integrantes del complejo *Phaseolus vulgaris*- *P. coccineus* (exceptuando GLA) comparten el mismo origen genético y no han sufrido una diferenciación genética lo suficientemente grande como para que se puedan distinguir con la técnica de GISH a los genomas de cada una de ellas, lo cual, por otro lado aunque no necesariamente, también estaría sugiriendo un origen más o menos reciente y cuyo espacio de tiempo no ha sido tan amplio como para que se acumulen mayor número de divergencias. Davis y Gilmartin (1985) al realizar un análisis sobre variación fenotípica y especiación en diferentes plantas superiores, encuentran que en algunas de ellas existe una fuerte diferenciación morfológica como resultado de cambios genéticos muy pequeños; esto mismo puede estar ocurriendo en el complejo *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus*.

HIBRIDACIÓN DE DOT BLOTS

Cuando se realizó la hibridación *ex situ* sobre membrana de nitrocelulosa, utilizando P^{32} (fósforo radiactivo), los resultados logrados vinieron a confirmar los obtenidos con **GISH**. Con ambas técnicas se logró casi el mismo grado de hibridación.

La figura 11 muestra el grado de hibridación que presentó **COC** con los distintos integrantes del complejo *Phaseolus vulgaris-P. coccineus*, al igual que con *P. leptostachyus*, que fue utilizada como especie testigo.

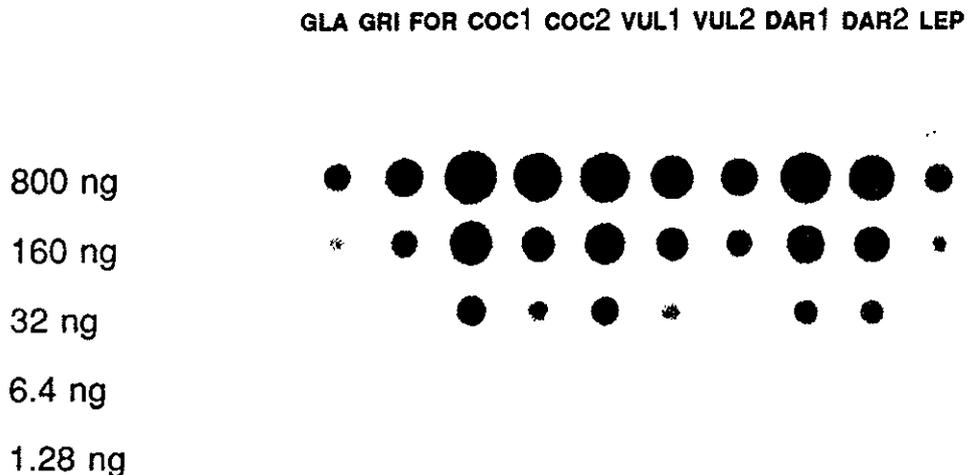


Fig 11. Hibridación genómica *ex situ* "Dot Blots". El ADN genómico de las distintas especies fue hibridado con el ADN genómico total de **coc2**. Es notorio que **VUL** muestra menor semejanza con **COC**, no así **DAR** que mostró ser muy similar; **GLA** y *P. leptostachyus* fueron las especies que presentaron menor similitud genética con el ADN prueba.

La intensidad y el tamaño de la mancha de hibridación en **Dot Blots** está indicando que la relación genética que existe entre **COC** con **DAR** es más estrecha que con **VUL**. Es notorio que las poblaciones silvestres y cultivadas de **VUL** mostraron una hibridación menor con **COC** que la que presentó **DAR** con **COC**, en donde, de acuerdo con la intensidad y el tamaño de las manchas registradas, parecen indicar una similitud genética cercana al 100%. A diferencia de la hibridación con **GISH**, en este caso es posible establecer, por la intensidad de la mancha, que a nivel de ADN nuclear, **COC** está más relacionada con **DAR** que con **VUL**, pero nuevamente se aprecia que existe un alto grado de homología en las secuencias de ADN en los tres taxa involucrados.

Al analizar la similitud genética que guardan **FOR**, **GLA** y **GRI** con **COC**, se aprecia que es **FOR** la más cercana, siguiéndole **GRI**, situación idéntica a la que se observó con la técnica de **GISH**. Al considerar el caso de **GLA**, se aprecia que el grado de hibridación con **COC** es muy parecida a la que presentó ésta con **LEP**. Lo anterior no indica que **GLA** y **LEP** sean análogos genéticamente; lo que implica es que la distancia genética que separa a ambos taxa de **COC** es cualitativamente muy similar, pero sin indicar que en ambas especies sean los mismos genes los que están determinando esta diferencia génica. De los anteriores resultados es posible apreciar que **GLA** nuevamente se caracterizó por presentar un esquema distinto al resto de los integrantes del complejo *Phaseolus vulgaris-P. coccineus*,

con lo que de nueva cuenta se percibe que dicha subespecie no se encuentra genéticamente tan relacionada como para seguir considerándola una subespecie de **COC** y sugiriendo una vez más que debe retomar su rango específico.

Con la finalidad de caracterizar en forma cuantitativa y no únicamente cualitativa los resultados proporcionados con la hibridación genómica con **DOT BLOTS**, se midió el diámetro de cada una de las manchas de hibridación y se compararon entre sí. Aquellas que mostraron una diferencia en el diámetro menor o igual al 10% fueron consideradas arbitrariamente como de la misma intensidad y se les otorgó un valor de 1, mientras que las que presentaron una diferencia en diámetro entre el 10.1 y 20% se juzgaron diferentes y se les asignó un valor de 2, y así sucesivamente por cada 10% de divergencia motivaron el otorgamiento de una unidad más. La asignación de valores anteriormente descrita fue realizada para cada una de las concentraciones de ADN utilizadas. Considerando lo anterior fue que se otorgó un valor de 1 a **COC 1**, **COC 2**, **DAR 1** y **FOR**; 2 para **DAR 2** y **VUL 1**; 3 para **VUL 2** y **FOR**; 4 para **LEP**, y 5 para **GLA** en la concentración de 800 ng. Las estimaciones del diámetro de la mancha para cada una de las concentraciones arrojaron los siguientes valores:

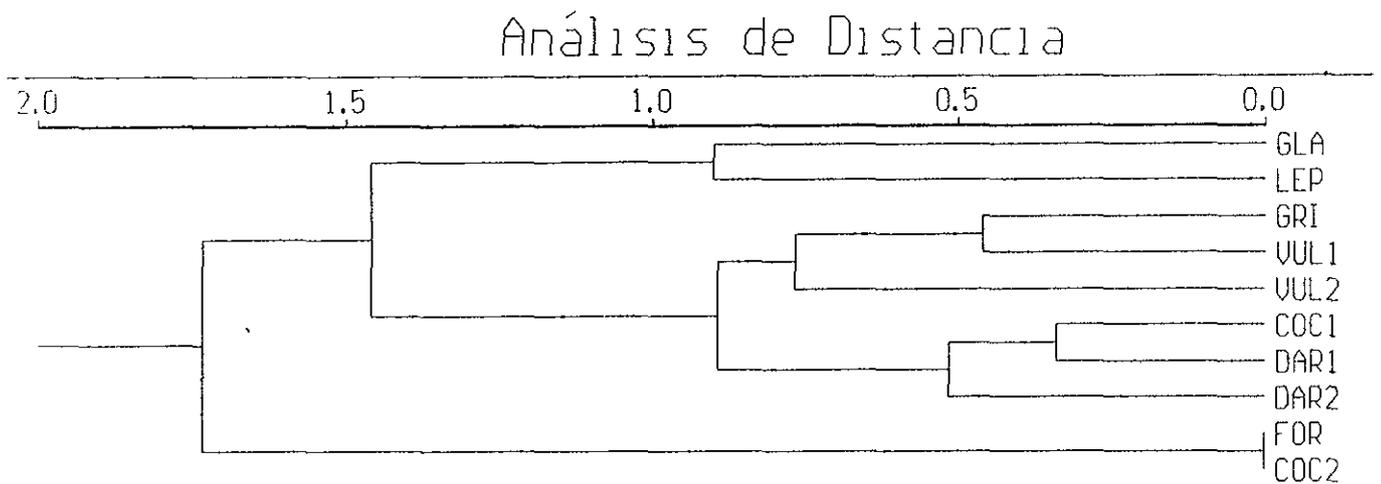
ADN (conc.)	T A X A									
	GLA	GRI	FOR	COC1	COC2	VUL1	VUL2	DAR1	DAR2	LEP
800 ng	5	3	1	1	1	2	3	1	2	4
160 ng	4	3	1	3	1	3	4	2	2	5
32 ng	5	2	1	2	1	2	3	2	2	3
6.4 ng	4	4	1	1	1	3	2	1	2	4
1.28 ng	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2
TOTAL	20	14	5	9	5	12	14	8	10	18

Los valores numéricos de las columnas corresponden a cada una de las manchas obtenidas después de haber llevado a cabo la hibridación de **DOT BLOTS**. De los valores mostrados en la matriz, los más pequeños son los que están indicando una mayor similitud genética con el ADN prueba que se utilizó y que corresponde al proveniente del estado de Durango (COC 2). Como era de esperarse, el ADN de COC empleado como prueba, es el más relacionado con su propio ADN colocado en la membrana; en el mismo nivel de analogía se encuentra FOR y, siguiendo en orden decreciente en cuanto a similitud, el arreglo es el siguiente:

TAXA	UNIDADES
COC cultivado	5
FOR	5
DAR silvestre	8
COC silvestre de Chihuahua	9
DAR cultivado	10
VUL silvestre	12
VUL cultivado	14
GRI	14
LEP	18
GLA	20

Resulta conveniente señalar que especies que presentan los mismos valores, como es el caso de VUL cultivado con GRI no significa que sean iguales entre sí. Estos datos indican que la cantidad de diferencias genéticas son similares respecto al ADN con el que se están probando, aunque su tipo no lo conocemos; sin embargo, entre más intensa sea la hibridación con el ADN que se está probando, sí se está evidenciando una mayor similitud genética como fue el caso de COC2 con FOR.

Al introducir los valores obtenidos de las mediciones de las manchas de los **DOT BLOTS** a un programa de análisis de distancia de similitud, se obtiene la matriz mostrada en el **apéndice 3**, que da como resultado el siguiente **dendrograma con un coeficiente de correlación de $r= 0.78$** :



Se aprecia que **VUL** esta fuera de la rama que agrupa a **FOR**, **DAR** y a **COC**; así, la relación genética entre estos dos últimos taxa es similar a la registrada por Piñero y Eguiarte (1988) en sus estudios electroforéticos en donde encuentran que las relaciones genéticas entre **DAR** con **COC**, son más estrechas que con **VUL**. La posición que presenta **FOR** con **COC** es la esperada de acuerdo con las características de similitud que encuentra Delgado-Salinas (1985) y que lo hacen otorgarle la categoría de *subespecie*. La integración del complejo queda de

manifiesto por la conformación del dendrograma y al observar que **VUL** se encuentra dentro de la misma rama que está agrupando a **GRI**, la otra subespecie de *P. coccineus*. Esta misma relación de las subespecies de *P. coccineus* fue observada con la hibridación genómica *in situ*.

Por otro lado, **GLA** en este análisis se coloca nuevamente en una posición distante del resto de los taxa integrantes del complejo *Phaseolus vulgaris-P. coccineus* y que en el dendrograma se ubica en el mismo clado con **LEP** especie utilizada como testigo, indicando así que ambas especies se encuentran fuera del complejo.

Al analizar los resultados obtenidos con **GISH** y con **DOT BLOTS** se evidencia que ninguna de las dos técnicas es capaz de resolver el propuesto origen híbrido o derivación directa de **DAR** y únicamente indican que en todos los taxa involucrados en el complejo existe una gran similitud genómica con excepción de **GLA**, que con la aplicación de la hibridación genómica *in situ* mostró una menor relación con el resto de las especies y subespecies analizadas, además de que con la hibridación *ex situ* (**DOT BLOTS**), igualmente se ubicó en una posición distante. La alta similitud genética mostrada en este estudio, la constancia del número cromosómico con poca variación cariotípica (Mercado-Ruaro y Delgado-Salinas, en prensa), así como los resultados que sobre hibridación convencional se han logrado entre varias especies de *Phaseolus* (Honma, 1956; Honma y

Heeckt, 1959; Smartt, 1970; Maréchal, 1971; Thomas y Waines, 1984; Hucl y Scoles, 1985; Baudoin *et al.*, 1986; Baudoin y Katanga, 1990) indican que genéticamente los integrantes del complejo *Phaseolus vulgaris-P.coccineus* muestran un alto grado de homología, razón por la cual ha sido posible la obtención de híbridos viables en varias de las cruzas realizadas. No obstante, las diferencias genéticas puntuales o de segmentos cromosómicos pequeños (no detectados con **GISH** o **DOT BLOTS**) que presentan cada uno de los taxa y que le confieren determinadas características morfológicas, junto con las distintas condiciones ambientales en que se desarrollan cada una de las especies, son las que han permitido la diferenciación de cada uno de los taxa reconocidos. El alto grado de homología, así como la hibridación natural que se lleva a cabo entre varias especies del complejo *Phaseolus vulgaris-P. coccineus* y sirviendo las especies cultivadas como puentes, tal vez están indicando que se trata de un singámeon, como ha sido planteado por Grant (1981), entendiéndose como un grupo de especies o semiespecies que están ligadas por una hibridación frecuente u ocasional en la naturaleza, situación que ocurre entre *P. coccineus*, *P. coccinues* subsp.*darwinianus* (*P. polyanthus*) y *P. vulgaris*, junto con su contraparte silvestre en cada una de las especies.

CONCLUSIONES

- ★ La aplicación de la hibridación genómica *in situ* (**GISH**) y *ex situ* (**DOT BLOTS**) no resuelve el problema del origen híbrido o de derivación directa de *Phaseolus coccineus* subsp. *darwinianus*; la falta de resolución de las técnicas es debido a la alta homología genómica existente entre *P. coccineus*, *P. vulgaris* y *P. coccineus* subsp. *darwinianus*.
- ★ De acuerdo con las técnicas utilizadas, *Phaseolus coccineus* subsp. *darwinianus* está más relacionado con *P. coccineus* que con *P. vulgaris*.
- ★ Dentro de las subespecies de *Phaseolus coccineus*, la subsp. *formosus* es la que presenta una mayor homología con el progenitor que le dio origen.
- ★ Con la aplicación de **GISH** y de **DOT BLOTS**, *Phaseolus coccineus* subsp. *glabellus* (*sensu* Delgado, 1985) resultó ser la menos relacionada genéticamente dentro del complejo *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus*, apoyándose así la postura de que el taxon merece la categoría de especie y de que debe ubicarse fuera de este complejo .

★ Antes de llevar a cabo la hibridación genómica *in situ* es conveniente realizar la hibridación de **DOT BLOTS**, la cual es más rápida y sencilla de realizar y nos proporciona información sobre el grado de similitud genética que existe entre los organismos que se analizan y de esta forma descartar la hibridación con **GISH** en especies que sean genéticamente muy similares.

REFERENCIAS

- Al-Yasiri, A. A. y D. P. Coyne. 1966. Interspecific hybridization in the genus *Phaseolus*. *Crop Science* 6: 59-60.
- Almeda, F. y T. I. Chuang. 1992. Chromosome numbers and their systematic significance in some Mexican Melastomataceae. *Systematic Botany* 17: 583-593.
- Alvarez, M. N., P. D. Ascher y D. W. Davis. 1981. Interspecific hybridization in *Euphaseolus* through embryo rescue. *HortScience* 16: 541-543.
- Baudoin, J. P., F. Camarena y R. Maréchal. 1986. Interspecific crosses between *Phaseolus coccineus* subsp. *polyanthus* M.M. & S., as seed parent, and *Phaseolus vulgaris* L. *Bean Improvement Cooperative* 29: 64.
- Baudoin, J. P. y K. Katanga. 1990. Phyletic relationships within the genus *Phaseolus* on basis of pollen morphology and experimental hybridization. *Bean Improvement Cooperative* 33: 117-118.
- Bennett, S. T., A. Y. Kenton y M. D. Bennett. 1992. Genomic *in situ* hybridization reveals the allopolyploid nature of *Milium montianum* (Gramineae). *Chromosoma* 101: 420-424.
- Braak, J. P. y E. Kooistra. 1975. A successful cross between *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus ritensis* Jones with the aid of the embryo culture. *Euphytica* 24: 669-679.

- Callimassia, M. A., B. G. Murray, K. R. W. Hammett y M. D. Bennett. 1994. Parental genome separation and asynchronous centromere division in interspecific F₁ hybrids in *Lathyrus*. *Chromosome Res.* 2: 383-397.
- Camarena, F. y J. P. Baudoin. 1987. Obtention des premiers hybrides interspécifiques entre *Phaseolus vulgaris* et *Phaseolus polyanthus* avec le cytoplasme de cette dernière forme. *Bull. Rech. Agron. Gembloux* 22: 43-55.
- Chen, Q. y K. Armstrong. 1994. Genomic *in situ* hybridization in *Avena sativa*. *Genome* 37: 607-612.
- Conger, A. D. y L. M. Fairchild. 1953. A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain Technol.* 28: 281-283.
- Coyne, D. P. 1964. Species hybridization in *Phaseolus*. *J. Heredity* 55: 5-6.
- Cronquist, A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. New York Botanical Garden. New York.
- Davis, J. I y A. J. Gilmartin. 1985. Morphological variation and speciation. *Syst. Bot.* 10: 417-425.
- Debouck, D. 1991. Systematics and morphology. *In: A. van Schoonhoven y O. Voysest (eds.). Common beans: research for crop improvement. Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, United Kingdom. pp. 55-118.*
- Delgado-Salinas, A. 1985. Systematics of the genus *Phaseolus* in Mexico and Central America. Ph.D. dissertation. Univ. of Texas, Austin.

- Doyle, J. J. y J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Frediani, M., R. Cremonini, G. Salvi, C. Caprari, A. Desiderio, R. D'Oviedo, F. Cervone y G. De Lorenzo. 1993. Cytological localization of the PGIP genes in the embryo suspensor cells of *Phaseolus vulgaris* L. *Theor. Appl. Genet.* 87: 369-373.
- Gall, J. G. y M. L. Pardue. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 378-383.
- Gepts, P. 1996. Origin and evolution of cultivated *Phaseolus* species. *In: B. Pickersgill, y J. M. Lock (eds.). Advances in legume systematics. Part 8. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 65-74.*
- Goldblatt, P. 1981. Cytology and the phylogeny of Leguminosae. *In: R. M. Polhill y P. H. Raven (eds.). Advances in legume systematics. Part 2. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 427-463.*
- Grant, V. 1981. *Plant speciation. 2ª edición. Columbia University Press. New York, 563 pp.*
- Green, D. M., J. P. Bogart y E. H. Anthony. 1980. An interactive, microcomputer-base karyotype analysis system for phylogenetic cytotaxonomy. *Comput. Bio. Mec.* 10: 219-227.
- Haq, M. N., G. R. Lane y J. Smartt. 1980. The cytogenetics of *Phaseolus vulgaris* L., *Phaseolus coccineus* L, their interspecific hybrids, derived amphidiploid and backcrosses progeny in relation to their potential exploitation in breeding. *Cytologia* 45: 791-798.

- Herendeen, P. S., W. L. Crepet y D. L. Dilcher. 1992. The fossil history of the Leguminosae: Phylogenetic and biogeographic implications. *In*: P. S. Herendeen y D. L. Dilcher (eds.). *Advances in legume systematics. Part 4.* Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 303-316.
- Hernández X., E., S. Miranda y C. Prywer. 1959. El origen de *Phaseolus coccineus* L. *darwinianus* Hdz. X. & Miranda C., subespecies nova. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 20: 99-121.
- Heslop-Harrison, J. S. 1992. Molecular cytogenetics, cytology and genomic comparisons in the Triticeae. *Hereditas* 116: 93-99.
- Honma, S. 1956. A bean interspecific hybrid. *J. Heredity* 47: 217-220.
- Honma, S. y O. Heeck. 1959. Interspecific hybrid between *Phaseolus vulgaris* and *P. lunatus*. *J. Heredity* 50: 233-237.
- Hucl, P. y G. J. Scoles. 1985. Interspecific hybridization in the common bean: a review. *HortScience* 20: 352-357.
- Jellen, E. N., B. S. Gill y T. S. Cox. 1994. Genomic *in situ* hybridization differentiates between A/D- and C-genome chromatin and detects intergenomic translocations in polyploid oat species (genus *Avena*). *Genome* 37: 613-618.
- John, H. A., M. L. Birnstiel y K. W. Jones. 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223: 582-587.

- Kenton, A., A. S. Parokonny, Y. Y. Gleba y M. D. Bennett. 1993. Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. *Mol. Gen. Genet.* 240: 159-169.
- Kenton, A. , A. S. Parokonny, I. J. Leitch y M. D. Bennett. 1997. Cytological characterization of somatic hybrids: Detection of genome origin by genomic *in situ* hybridization (GISH). *In: M. S. Clark (ed.). Plant molecular biology- A laboratory manual.* Springer-Verlag. Berlin. pp. 486- 511.
- Klos, J. y E. Klosova. 1968. Variability of proteins I and II in the seeds of species of the genus *Phaseolus*. *In: J. G. Hawkes (ed.). Chemotaxonomy and serotaxonomy.* Academic Press. London. pp. 93-102.
- Kumari, S. y S. S. Bir. 1985. Karyomorphological evolution in Mimosoideae. *J. Cytol. Genet.* 20: 16-35.
- Lamprecht, von H. 1941. Die Artgrenze zwischen *Phaseolus vulgaris* L. und *multiflorus* Lam. *Hereditas* 27: 51-175.
- Lackey, J. A. 1979. A chromosome atlas of the Phaseoleae (Leguminosae-Papilionoideae). *Iselya* 1: 87-114.
- Lackey, J. A. 1981. Tribe 10. Phaseoleae DC. (1825). *In: R. M. Polhill y P. H. Raven (ed.). Advances in legume systematics. Part 1.* Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 301-327.
- Lackey, J. A. 1983. A review of generic concept in American Phaseolinae (Fabaceae, Faboideae). *Iselya* 2: 21-64.

- Leitch, A. R., T. Schwarzacher, D. Jackson y I. J. Leitch. 1994. *In situ* hybridization: A practical guide. Microscopy handbooks 27. Bios Scientific Publishers. Oxford. 118 pp.
- Leitch, I. J., A. Y. Kenton, A. S. Parokonny y M. D. Bennett. 1997. *In*: M. S. Clark (ed.). Plant molecular biology- A laboratory manual. Springer-Verlag. Berlín. pp. 461-485.
- Llaca, V., A. Delgado y P. Gepts. 1994. Chloroplast DNA as an evolutionary marker in the *Phaseolus vulgaris* complex. Theor. Appl. Genet. 88: 646-652.
- Maréchal, R. 1971. Observations sur quelques hybrides dans le genre *Phaseolus*. II. Les phénomènes méiotiques. Bull. Rech. Agron. Gembloux 6: 461-489.
- Maréchal, R, J. Mascherpa y F. Stainier. 1978. Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. Boissiera 28: 1-273.
- Mercado-Ruaro, P. y A. Delgado-Salinas. 1996. Karyological studies in several Mexican species of *Phaseolus* L. and *Vigna* Savi (Phaseolinae, Fabaceae). *In*: B. Pickersgill y J. M. Lock (eds.). Advances in legume systematics. Part 8. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 83-87.
- Mercado-Ruaro, P. y A. Delgado-Salinas. Karyotypic studies on species of *Phaseolus* (Fabaceae- Phaseolinae). Amer. J. Bot. 85. En Prensa.

- Miranda C., S. 1967. Infiltración genética entre *Phaseolus coccineus* L. y *Phaseolus vulgaris* L. Serie de Investigación 9. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 48 pp.
- Mok, D. W. S., M. C. Mok y A. Rabakoarihanta. 1978. Interspecific hybridization of *Phaseolus vulgaris* with *P. lunatus* and *P. acutifolius*. Theor. Appl. Genet. 52: 209-215.
- NAS (National Academy of Sciences). 1979. Tropical legumes: Resources for the future. Washington, D. C. 331 pp.
- Nenno, M., K. Schumann y W. Nagl. 1993. Mapping phaseolin genes to polytene chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Bean Improvement Cooperative 36: 3-4.
- Parokonny, A. S., A. Y. Kenton, L. Meredith, S. J. Owens y M. D. Bennett. 1992. Genomic divergence of allopatric sibling species studied by molecular cytogenetics of their F₁ hybrids. Plant J. 2: 695-704.
- Parokonny, A. S. y A. Y. Kenton. 1995. Comparative physical mapping and evolution of the *Nicotiana tabacum* L. karyotype. In: P. E. Brandham y M. D. Bennett (eds). Kew chromosome conference IV. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 301-320.
- Piper, C. V. 1926. Studies in American Phaseolinae. Contr. U. S. Natl. Herb. 22: 663-701.
- Piñero, D. y L. Eguiarte. 1988. The origin and biosystematic status of *Phaseolus coccineus* ssp. *polyanthus*: electrophoretic evidence. Euphytica 37: 199-203.

- Polhill, R. M., P. H. Raven y C. H. Stirton. 1981. Evolution and systematics of the Leguminosae. *In*: R. M. Polhill y P. H. Raven (eds.). *Advances in legume systematics. Part 1.* Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 1-26.
- Rabakoarihanta, A., C. T. Shii, M. C. Mok y D. W. S. Mok. 1980. Meiosis and fertility of interspecific hybrids between *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius* A. Gray. *Theor. Appl. Genet.* 57: 59-64.
- Raven, P. H. y R. M. Polhill. 1981. Biogeography of the Leguminosae. *In*: R. M. Polhill y P. H. Raven (eds.). *Advances in legume systematics. Part 1.* Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 27-34.
- Rohlf, F. J. 1993. Ntsys-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Número de serie 165300. Applied Biostatistics Inc., New York.
- Sabja, A. M., D.W. S. Mok y M. C. Mok. 1990. Seed and embryo growth in pod cultures of *Phaseolus vulgaris* and *P. vulgaris* x *P. acutifolius*. *HortScience* 25: 1288-1291.
- Sarbhoj, R. K. 1977. Cytogenetical studies in the genus *Phaseolus* Linn. III. Evolution in the genus *Phaseolus*. *Cytologia* 42: 401-413.
- Sarbhoj, R. K. 1980. Karyological studies in the genus *Phaseolus* Linn. *Cytologia* 45: 363-373.
- Schmit, V. 1992. Etude de *Phaseolus polyanthus* Greenman et autres taxons du complexe *Phaseolus coccineus* L. PhD thèse. Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux. Belgique.

- Schmit, V. y D. G. Debouck. 1990. *Phaseolus glabellus* Piper, a noteworthy variant of the *P. coccineus* complex?. Bean Improvement Cooperative 33: 124-125.
- Schmit, V. y D. G. Debouck. 1991. Observations on the origin of *Phaseolus polyanthus* Greenman. Econ. Bot. 45: 345-364.
- Schmit, V., J. P. Baudoin y B. Wathelet. 1991. Considerations about the taxonomical position of various taxa of the *P. coccineus* complex on basis of seeds protein electrophoresis and experimental hybridizations. Bean Improvement Cooperative 34: 87-88.
- Schmit, V., D. G. Debouck y J. P. Baudoin. 1996. Biogeographical and molecular observations on *Phaseolus glabellus* (Fabaceae, Phaseolinae) and its taxonomic status. Taxon 45: 493-501.
- Schumann, K., A. Baumann y W. Nagl. 1990. Localization of phaseolin genes in the polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* (Leguminosae). Genetica 83: 73-76.
- Schwarzacher, T., A. R. Leitch, M. D. Bennett y J. S. Heslop-Harrison. 1989. *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. Ann. Bot. 64: 315-324.
- Sessions S. K. 1996. Chromosomes: molecular cytogenetics. In: D. M. Hillis, C. Moritz y B. K. Mable (eds.). *Molecular systematics*. 2ª edición. Sinauer associates, Inc. Massachusetts. pp. 121-168.
- Sinha, S. S. N. y H. Roy. 1979a. Cytological studies in the genus *Phaseolus* : Mitotic analysis of fourteen species. Cytologia 44: 191-199.

- Sinha, S. S. N. y H. Roy. 1979b. Cytological studies in the genus *Phaseolus* II. Meiotic analysis of sixteen species. *Cytologia* 44: 201-209.
- Smartt, J. 1970. Interspecific hybridization between cultivated American species of the genus *Phaseolus*. *Euphytica* 19: 480-489.
- Smartt, J. 1973. The possible status of *Phaseolus coccineus* L. ssp. *darwinianus* Hdz. X. et Miranda C. as a distinct species and cultigen of the genus *Phaseolus*. *Euphytica* 22: 424-426.
- Smartt, J. y N. Haq. 1972. Fertility and segregation of the amphidiploid *Phaseolus vulgaris* L. x *P. coccineus* L. and its behaviour in backcrosses. *Euphytica* 21: 496-501.
- Sousa, S. M. 1986. Fabaceae. *In*: D. E. Breedlove. *Listados florísticos de México IV. Flora de Chiapas*. México. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. pp. 90-112.
- Sousa, S. M. y A. Delgado. 1993. Mexican leguminosae: Phytogeography, endemism, and origins. *In*: T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds.). *Biological diversity of Mexico*. Oxford University Press. New York. pp. 459-511.
- Stebbins, G. L. 1971. *Chromosomal evolution in higher plants*. Edward Arnold, London. 216 pp.
- Thomas, B. 1973. Evolutionary implications of karyotypic variation in some insular *Peromyscus* from British Columbia, Canada. *Cytologia* 38: 485-495.

- Thomas, H. 1964. Investigations into the inter-relationships of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* Lam. *Genetica* 35: 59-74.
- Thomas, C. V. y J. G. Waines. 1984. Fertile backcross and allotetraploid plants from crosses between tepary beans and common beans. *J. Heredity* 75: 93-98.
- Thomas, H. M., W. G. Morgan, M. R. Meredith, M. W. Humphreys, H. Thomas y J. M. Leggett. 1994. Identification of parental and recombined chromosomes in hybrid derivatives of *Lolium multiflorum* x *Festuca pratensis* by genomic *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 88: 909-913.
- Verdcourt, B. 1970. Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the flora of tropical East Africa: IV. *Kew Bull.* 24: 507-569.
- Zheng, J., J. Nakata, H. Uchiyama, H. Morikawa y R. Tanaka. 1991. Giemsa C-banding patterns in several species of *Phaseolus* L. and *Vigna* Savi, Fabaceae. *Cytologia* 56: 459-466.

APÉNDICE 1

REACTIVOS Y SOLUCIONES UTILIZADOS

Ácido acético glacial	Dodecil sulfato de sodio
Acetato de sodio	Extrán sulfato
ADNasa	F-avidina
ADN de esperma de salmón	Formamida
ADN polimerasa	Isopropanol
Alcohol etílico absoluto	N-Lauryl sarcosina
Alcohol isoamílico	P ³²
ARNasa	Pectinasa
Bloqueador de suero de cabra	Suero de albúmina de bovino
Celulasa	Vectashield
Cloroformo	Yoduro de propidio
DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol)	

Fijador Farmer: 3 partes de alcohol etílico absoluto y una parte de ácido acético glacial.

Solución 2X de enzimas:

2% (peso/volumen) de celulasa

20% (v/v) de pectinasa

Se prepara en amortiguador 1X para las enzimas. Se almacenan alícuotas a -20°C

SOLUCIONES AMORTIGUADORAS

- Amortiguador 10X para las enzimas (pH 4.8):
Acido cítrico 40 mM
Citrato de sodio 60 mM
- Amortiguador de extracción
40 ml de EDTA 0.5 M (diamino etileno)
100 ml de Tris HCl 1M (pH 8.0)
280 ml NaCl 5M
20 gr de CTAB (CetilTrimetilAmonioBromuro)
580 ml de H₂O destilada
- 20xSSC pH 7.0
3 M NaCl
0.3 M citrato de sodio.
Se utilizan 175 gr de NaCl y 88 gr de citrato de trisodio dihidratado, se disuelven en 800 ml de agua destilada y entonces se afora a un litro. De esta solución se hacen las diluciones necesarias.
- 1XPBS (amortiguador salino de fosfato) pH 7.4
Se disuelven 8 gr de NaCl, 0.2 gr de KCl, 1.44 gr de Na₂HPO₄ en 800 ml de agua destilada. Se ajusta el pH a 7.4 con HCl. Se afora a un litro.
- Tris HCl
Se prepara a la molaridad requerida con agua y se ajusta el pH con HCl 1 M.

- 100 x TE pH 8.0
Tris-HCl 10 mM, pH 8.0
EDTA 0.1 M, pH 8.0

- NTB
75 mg/ml⁻¹ de cloruro de nitrosolio 4-nitroazul en dimetilformamida al 70%

- 10X BN
84 gr de carbonato de sodio que se disuelven en un litro de agua destilada y
agregar 5 ml de Tween-20

rediprime

Random Primer DNA
Labelling System

2 reaction sample pack

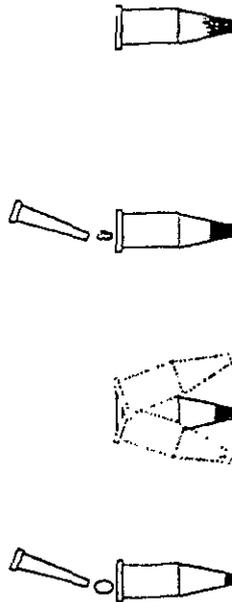
Before using this product, please read the instructions below for safe handling and disposal.

Amersham International plc
Amersham Place
Little Chalfont
Buckinghamshire HP7 9NA
England

RPN 1631

For use with Redivue™
[α-³²P]dCTP (AA0005)

Store at room temperature



Summary protocol

Add denatured DNA template in a final volume of 45µl. Thick the tube to mix, spin briefly. Add 5µl of [α-³²P]dCTP, incubate 10 minutes to mix, spin briefly.

rediprime

RANDOM PRIMER LABELLING

Add 5µl of [α-³²P]dCTP, incubate 10 minutes to mix, spin briefly.

Warning: For research use only. Not recommended or intended for diagnosis of disease in humans or animals. Do not use internally or externally in humans or animals.

Caution: For use with radioactive material. This product is to be used with radioactive material. Please follow the manufacturer's instructions relating to the handling, use, storage and disposal of such material.

This product contains one or more chemical substances supplied in small quantities. In the form supplied, these substances are not classified as dangerous within the meaning of the definitions of the Council of European Communities Directive 76/548/EEC and subsequent amendments.

All chemicals should be considered as potentially hazardous. We therefore recommend that this product is handled only by those persons who have been trained in laboratory techniques and that it is used in accordance with the principles of good laboratory practice. Wear suitable protective clothing such as laboratory overalls, safety glasses and gloves. Care should be taken to avoid contact with skin or eyes. In the case of contact with skin or eyes, wash immediately with water.

Storage and stability

Upon receipt of the system store it at room temperature between 18°C and 25°C. The system is stable for at least 6 months when stored under the recommended conditions.

Quality control

The Rediprime™ DNA labelling system is tested by our quality control group to ensure an incorporation rate greater than 55% after 10 minutes at 37°C using 50µCi Redivue [α-³²P]dCTP (AA0005).

System components

Each tube contains a labelling mix comprising a buffered solution of dATP, dGTP, dTTP, random nonamer primers, exonuclease free Klenow and an inert dye in a dried stabilized form.

All goods and services are sold subject to the terms and conditions of supply of the company within the Amersham group which applies here. A copy of these terms and conditions is available on request.

Amersham International plc, 1993 - all rights reserved.
Amersham, Rediprime and Redivue are trademarks of Amersham International plc.

Amersham LIFE SCIENCE

Rediprime DNA labelling protocol

The Rediprime system allows DNA from a variety of sources to be labelled *in vitro* to high specific activity using [³²P]dCTP. The system has been designed for use with Redivue™ [α -³²P]dCTP with a specific activity of 3000Ci/mmol. Each labelling mix can label up to 25ng of DNA and after incubation for 10 minutes at 37°C probes with specific activity of 1.9 x 10⁹ dpm/ μ g or greater can be produced.

DNA prepared by standard miniprep methods may be used. Solutions that are too dilute to be used directly should be concentrated by ethanol precipitation. Redissolution in $\leq 45\mu$ l of water or 10mM Tris/HCl pH8, 1mM EDTA is recommended. DNA in restriction enzyme buffers may be added directly to the reaction.

DNA fragments in LMP agarose may also be labelled following melting and dilution of agarose with sterile water (3ml water/gram of gel). Denature the DNA prior to use by heating in a boiling water bath for 5-10 minutes and dilute with water to give a final DNA concentration of 2.5-25ng in 45 μ l. Reaction times for labelling DNA in LMP agarose should be extended to 15-30 minutes at 37°C.

REORDERING INFORMATION

rediprime
Random primer DNA labelling system

30 reactions RPN 1633
60 reactions RPN 1634

Protocol

- 1) Dilute the DNA to be labelled to a concentration of 2.5-25.0ng in 45 μ l of sterile water or 10mM Tris/HCl pH8, 1mM EDTA.
- 2) Denature the DNA sample by heating to 95-100°C for 5 minutes in a boiling water bath.
- 3) Centrifuge briefly to bring the contents to the bottom of the tube.
- 4) Add the denatured DNA to the labelling mix and reconstitute the mix by gently flicking the tube until the blue colour is evenly distributed.
- 5) Centrifuge briefly to bring the contents to the bottom of the tube.
- 6) Add 5 μ l of Redivue [³²P]dCTP and mix by gently pipetting up and down 4 to 5 times.
- 7) Centrifuge briefly to bring the labelled mix to the bottom of the tube.
- 8) Incubate at 37°C for 10 minutes.
- 9) Stop the reaction by adding 5 μ l of 0.2M EDTA. For use in hybridization denature the labelled DNA by heating at 95-100°C for 5 minutes, then chill on ice.

Notes

- 1) It is important that the final volume used to reconstitute the dry reaction mix is 45 μ l.
- 2) There is no need to snap cool the DNA on ice after denaturation.
- 4) Do not mix by pipetting up and down with a pipette tip. Labelling mix will stick on the pipette tip and the reaction will not proceed efficiently.
- 6) The reaction mix will change colour from blue to purple when reagents are completely mixed after the addition of Redivue.
- 8) If desired, the labelling reaction can be allowed to proceed at room temperature, or may also be left to proceed overnight. Probes of high specific activity equivalent to those produced at 37°C may be obtained in 20-60 minutes at room temperature.
- 9) If required, the labelled DNA may be purified to remove unincorporated nucleotides by gel filtration or by selective precipitation.

APÉNDICE 3

Input matrix: A:\DONPERO.DIS

Comments:

" STAND: input=MATRIZ.SYS, divide=STD, subts=YBAR, direction=Row

" SIMINT: input=MATROW.STD, coeff=DIST, direction=Cols

type=2, size=10 by 10, nc=none

	GLA	GRI	FOR	COC1	COC2	VUL1	VUL2	DAR1	DAR2	LEP
GLA	0.000									
GRI	1.361	0.000								
FOR	2.672	1.772	0.000							
COC1	2.013	1.185	1.317	0.000						
COC2	2.672	1.772	0.000	1.317	0.000					
VUL1	1.569	0.460	1.511	0.739	1.511	0.000				
VUL2	1.200	0.843	1.808	0.880	1.808	0.689	0.000			
DAR1	2.097	1.233	1.179	0.340	1.179	0.814	1.058	0.000		
DAR2	1.773	0.814	1.265	0.572	1.265	0.477	0.842	0.460	0.000	
LEP	0.900	0.842	2.338	1.585	2.338	1.058	0.814	1.757	1.426	0.000

X matrix: DONPERO.DIS

Comments:

" STAND: input=MATRIZ.SYS, divide=STD, subts=YBAR, direction=Row

" SIMINT: input=MATROW.STD, coeff=DIST, direction=Cols

type=2, size=10 by 10, nc=none

Y matrix: MATROW.COP

Comments:

" STAND: input=MATRIZ.SYS, divide=STD, subts=YBAR, direction=Row

" SIMINT: input=MATROW.STD, coeff=DIST, direction=Cols

" SAHN: input=MATROW.DIS, method=UPGMA, tie=WARN

" COPH: tree=MATROW.UPG

type=2, size=10 by 10, nc=none

X matrix stored in RAM memory.

Y matrix stored in RAM memory.

N = 45

Mean X = 1.27828 SSx = 16.47063

Mean Y = 1.27828 SSy = 10.03970

Tests for association:

Matrix correlation: $r = 0.78074$

(= normalized Mantel statistic Z)

Approximate Mantel t-test: $t = 4.737$

Prob. random Z < obs. Z: $p = 1.0000$