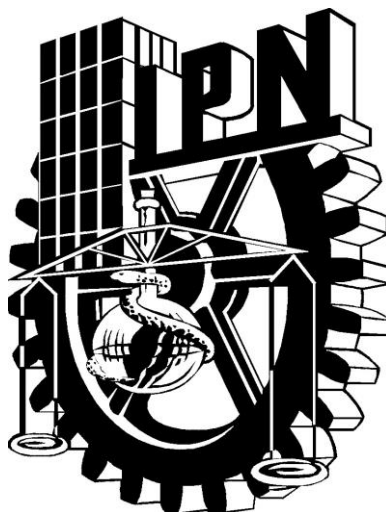


**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**



ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Phaseolus
coccineus* L. DE VERACRUZ, MÉXICO

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

RÉGULO RUÍZ SALAZAR

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. NORMA ALMARAZ ABARCA

DR. NETZAHUALCOYOTL MAYEK PÉREZ

Octubre de 2015

Reynosa, Tamps.

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**



ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Phaseolus
coccineus* L. DE VERACRUZ, MÉXICO

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

RÉGULO RUÍZ SALAZAR

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. NORMA ALMARAZ ABARCA

DR. NETZAHUALCOYOTL MAYEK PÉREZ



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 31 del mes de julio del año 2015, el (la) que suscribe Régulo Ruíz Salazar alumno(a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, con número de registro A100355, adscrito(a) al Centro de Biotecnología Genómica, manifiesto(a) que es el (la) autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del (de la, de los) Dr. Netzahualcoyotl Mayek Pérez y la Dra. Norma Almaraz Abarca y cede los derechos del trabajo titulado Análisis de la diversidad genética de *Phaseolus coccineus* L. de Veracruz, México, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del (de la) autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones Blvd. Del Maestro Esq. con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México. Tels: +52 (899) 9243627, 9251565. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Régulo Ruíz Salazar
Nombre y firma del alumno(a)



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. siendo las 12:00 horas del día 31 del mes de Julio del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CBG para examinar la tesis titulada:
"Análisis de la diversidad genética de Phaseolus coccineus L. de Veracruz, México"

Presentada por el alumno:

Ruíz	Salazar	Régulo
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
		Con registro:
		A 1 0 0 3 5 5

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

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

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Netzahualcoyotl Mayek Pérez

Dra. Norma Almaraz Abarca

Dr. Juan Manuel González Prieto

Dr. José Luis Hernández Mendoza

Dr. Gabriel Alejandro Iturbide

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Miguel Ángel Reyes López

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresarle mi sincera gratitud al Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional por abrirme sus puertas y darme la oportunidad y apoyo para realizar mis estudios Doctorales.

Agradezco de manera especial al Dr. Netzahualcóyotl Mayek Pérez y la Dra Norma Almaraz Abarca por sus consejos guía y apoyo en la realización del presente trabajo.

Mi sincero agradecimiento y respeto para el Ingeniero José Socorro Muruaga Martínez y la M. En C. María Luisa Patricia Vargas Vázquez por compartirme un poco de su amplio conocimiento sobre el género *Phaseolus* además de proporcionarme el germoplasma objeto del presente trabajo.

A la M. En C. Sanjuana Hernández Delgado por sus enseñanzas, orientación, tiempo y útiles consejos en el trabajo de laboratorio.

También quiero agradecer las becas otorgadas por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología beca número de registro 210061, al Programa Institucional de Formación de Investigadores del Instituto Politécnico Nacional (PIFI-IPN) y al Espacio Común de Educación Superior por la beca Santander otorgada.

Agradezco también al FOMIX-Gobierno del Estado de Veracruz (Proyecto no. 98070) por el apoyo financiero para el desarrollo del presente trabajo.

Finalmente a mis compañeros de laboratorio que de alguna manera me apoyaron durante la realización del presente trabajo, gracias.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres quienes me dieron vida, apoyo y consejos, también muy especialmente a mi esposa por todo su apoyo durante los años difíciles.

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1 Generalidades de <i>Phaseolus</i>	4
2.1.1 Distribución e importancia.....	5
2.1.2 Descripción taxonómica y botánica.....	6
2.1.3 Usos.....	8
2.2 Problemática del cultivo de frijol ayocote.....	9
2.3 Variedades mejoradas de frijol ayocote.....	11
2.4 Patrones de diversidad en <i>P. coccineus</i>	11
2.4.1 Tipos de germoplasma vegetal.....	12
2.4.2 Germoplasma de <i>P. coccineus</i>	15
2.5 Estudios morfoagronómicos y de diversidad en <i>P. coccineus</i>	15
2.6. Análisis genéticos en <i>Phaseolus</i>	15
2.7 Uso de Selección Asistida por Marcadores Moleculares en la detección de enfermedades en <i>Phaseolus</i> spp.....	19
III. JUSTIFICACIÓN	21
IV. HIPÓTESIS	23

V. OBJETIVOS	24
5.1 General.....	24
5.2 Específicos.....	24
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	25
VII. RESULTADOS (ARTÍCULOS)	27
7.1 Ruíz-Salazar, R., N. Mayek-Pérez, y P. Vargas-Vázquez. 2015. Diversidad morfoagronómica y recursos genéticos del frijol ayocote (<i>Phaseolus coccineus</i> L.) en México. Artículo de revisión.....	28
7.2. Ruíz-Salazar, R., M.L.P. Vargas-Vázquez, J.S. Muruaga-Martínez, S. Hernández-Delgado, G. Alejandro-Iturbide, N. Almaraz-Abarca & N. Mayek-Pérez. Analysis of Genetic Variability and Genetic Relationships of Ayocote Beans from México. Artículo de Investigación (en proceso de ser enviado a Botanical Sciences).....	53
7.3 Ruíz-Salazar, R., J.S. Muruaga-Martínez, M.L.P. Vargas-Vázquez, G. Alejandro-Iturbide, G. Castañón-Nájera, S. Hernández-Delgado, N. Almaraz-Abarca, y N. Mayek-Pérez. 2016. Marcadores moleculares SCAR para identificar fuentes de resistencia a enfermedades en frijol ayocote (<i>Phaseolus coccineus</i>). Trabajo aceptado en la revista <i>Phyton International Journal of Experimental Botany</i>	85
VIII. DISCUSIÓN GENERAL	119
IX. CONCLUSIONES	126
X. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS	127
XI. LITERATURA CITADA	128

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1	Localidades de las accesiones de <i>P. coccineus</i> empleadas en el análisis de la diversidad genética 29
Primer artículo	
Cuadro 1	Distribución geográfica y características edafoclimáticas de sitios originales de colecta de variedades nativas de <i>P. coccineus</i> L. resguardadas <i>ex situ</i> en INIFAP, México 40
Segundo artículo	
Table 1	Origins of <i>Phaseolus</i> germplasm analyzed with SSR and AFLP markers..... 75
Table 2	Sequences and traits of SSR markers used to analyze <i>Phaseolus</i> germplasm from Mexico..... 76
Table 3	Amplified bands by AFLP primer combinations applied on <i>P. coccineus</i> germplasm from Mexico..... 77
Table 4	AMOVA of 164 <i>Phaseolus</i> accessions analyzed with SSR and AFLP markers..... 78
Table 5	Genetic diversity indexes calculated by SSR locus..... 79
Table 6	Genetic diversity indexes calculated for SSR and AFLP marker analyses..... 80

Tercer artículo

Cuadro 1	Origen, población, especie y número de accesiones de <i>Phaseolus</i> sp., usadas en el análisis genético con nueve marcadores moleculares SCAR.....	113
Cuadro 2	Secuencias de iniciadores SCAR usados en <i>Phaseolus</i> sp. para identificar los genes que confieren resistencia a Tizón común, Virus del mosaico común del frijol, Virus del mosaico dorado y Mancha angular del frijol.....	114
Cuadro 3	Programa de PCR para la amplificación de los marcadores moleculares SCAR.....	115
Cuadro 4	Cuadro 4. Frecuencias de amplificación de bandas SCAR en frijol (<i>Phaseolus</i> sp.).....	116

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	Distribución geográfica de los sitios de colecta de las accesiones silvestres de los estados de Morelos, Querétaro, Tlaxcala, Hidalgo, Nayarit, Oaxaca, Distrito Federal, Estado de México y Michoacán y cultivadas de <i>Phaseolus</i> de Puebla y Veracruz..... 25
Primer artículo	
Figura 1	Análisis molecular de 31 accesiones de <i>Phaseolus</i> 35
Figura 2	Características de la vaina de ayocote, <i>P. vulgaris</i> x <i>P. coccineus</i> (híbrido natural) y <i>P. vulgaris</i> . Los grupos 1 y 2 de <i>Phaseolus coccineus</i> son poblaciones que difieren desde el punto de vista morfológico..... 44
Figura 3	Esquema clásico en el mejoramiento de <i>Phaseolus coccineus</i> ; SAMM= Selección Asistida por Marcadores Moleculares..... 45
Segundo artículo	
Figure 1	Dendrogram of 164 <i>Phaseolus</i> accessions by using 16 SSR loci (a) and six +3/+3 AFLP (b) primer combinations..... 81
Figure 2	Graphs of population structure of scarlet runner bean with K=7 and K=8 where each color represent an individual population with SSR data..... 81
Figure 3	Graphs of population structure of scarlet runner bean with K=7 and K=8 where each color represent an individual population with AFLP data..... 81

Tercer artículo

Figura 1	Distribución geográfica de los sitios de colecta de las accesiones silvestres y cultivadas de <i>Phaseolus</i> spp de Puebla y Veracruz.....	117
Figura 2	Dendograma de 16 poblaciones de frijol de los estados de Veracruz y Puebla. México basado en marcadores SCAR.....	118

ABREVIATURAS

A= Adenina

ADN = Ácido Desoxirribonucleico

AMOVA = Análisis de Varianza Molecular (por sus siglas en inglés “Analysis of Molecular Variance”)

AFLP = Polimorfismo en Longitud de los Fragmentos Amplificados (por sus siglas en inglés “Amplified Fragment Length Polimorphisms”)

pb = Pares de bases (por sus siglas en inglés “base pairs”)

C = Citosina

cm = Centímetro

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

EDTA = Sal disódica del ácido Etilendiaminotetraacético

g = Gramo

G = Guanina

h= Horas

ID = Índice de diversidad

INIFAP = Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

ISSR = Inter-secuencias Simples Repetidas (por sus siglas en inglés “inter simple sequence repeat”)

L = Litro

M = Molar

min = Minuto

NaCl =Cloruro de sodio

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

PCR = Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en ingles “Polimerase Chain Reaction”)

RAPD = ADN Polimórfico Amplificado al Azar (por sus siglas en inglés ‘Randomly Amplified Polimorphic DNA’)

RFLP = Polimorfismo en Longitud de los Fragmentos de Restricción (por sus siglas en inglés “Restriction Fragments Length Polimorphism”)

s = Segundo

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

SAMM = Selección Asistida con Marcadores Moleculares.

SCAR = Secuencias Caracterizadas de Regiones Amplificadas (por sus siglas en inglés
“Sequences Characterized of Amplified Regions”)

T = Timina

Tris HCl = Trizma/ácido clorhídrico

U μL^{-1} = Unidades por microlitro

UPGMA = Método de Agrupamiento de Pares no Ponderados con Medias Aritméticas
(por sus siglas en inglés “Unweigthed Paired Grouping Method with Arithmetic
Averages”)

V = Voltios

X = Veces la concentración

RESUMEN

Con el objetivo de determinar la diversidad genética del frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) 107 accesiones originarias de diversas localidades del estado de Veracruz y 57 de otras regiones de México [15 accesiones de la forma silvestres de *P. coccineus*, 10 de frijol común (*P. vulgaris*), una de *P. lunatus* y una de *P. glabellus*] se analizaron con marcadores moleculares SSR (secuencias simples repetidas ó microsátélites) y AFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados). Además, con el propósito de identificar fuentes de resistencia a las enfermedades tizón común (TC), Virus del Mosaico Común del Frijol (BCMV), Virus del Mosaico Dorado del Frijol (BGMV) y mancha angular (MA), el germoplasma se analizó con base en la detección de nueve SCARs (regiones amplificadas con secuencia caracterizada), cuatro para TC, dos para BCMV, dos para BGMV y uno para MA. Los 16 marcadores SSR genómicos amplificaron 481 alelos, siendo 30 alelos por SSR el promedio de un intervalo de 14 a 41 alelos amplificados. Los SSR BM147 y BM154 produjeron el número más elevado de alelos (41 cada uno). El AMOVA indicó variación moderada dentro de accesiones (30.9 % de la varianza explicada) mientras que la variación entre accesiones fue alta con 55.5 %. Con las seis combinaciones AFLP +3/+3 utilizadas se amplificaron 529 bandas (457 polimórficas y 72 monomórficas) y en este caso la varianza genética molecular dentro de accesiones fue mayor (49.7 % de la varianza explicada) que entre accesiones (32.2 %). El análisis de conglomerados con enfoque Bayesiano indicó un número óptimo de poblaciones posibles de acuerdo con la estructura genética de $K = 7$ (marcadores SSR) y de $K = 8$ (marcadores AFLP). Las poblaciones de Veracruz mostraron mayores frecuencias de SCARs para BGMV, BCMV, TC y MA que las de Puebla. Las mejores poblaciones de ayocote en cuanto a número de SCARs amplificados fueron las de Jalapa, y Acultzingo en Veracruz y las de Nauzontla y Zacapoaxtla en Puebla. El análisis de conglomerados separó a las poblaciones de frijol evaluadas según la procedencia así como por la presencia de dos de los nueve marcadores SCAR amplificados (SU91 y LG5). Los análisis AFLP y SSR empleados en el presente estudio aportan una visión general del estado actual de la diversidad genética almacenada en el banco de germoplasma del INIFAP y nos da una idea de que tan útil puede ser en programas de mejoramiento genético con el objetivo de producir nuevas líneas

mejoradas de frijol destinadas al consumo humano. Las poblaciones estudiadas, principalmente las de Veracruz que presentaron las mayores frecuencias de SCARs pueden utilizarse en programas de mejoramiento genético de la resistencia a las enfermedades que más afectan al frijol en México.

ABSTRACT

In order to assess the genetic diversity of runner bean (*Phaseolus coccineus*), 107 accessions from different locations of the state of Veracruz and 57 from other regions of Mexico (which included 15 accessions of the wild form of *P. coccineus*, 10 common bean (*P. vulgaris*), one of *P. lunatus* and *P. glabellus*) were analyzed. For attaining objective, simple sequence repeats (SSR) or microsatellites, with 16 sets of primers, were used, which revealed 481 alleles (30 alleles per SSR. As the average of a range of 14 to 41 amplified alleles). The SSR's BM147 and BM154 produced the highest number of alleles (both 41). All markers was genomic origin. One AMOVA was performed to determine the levels of among and within accessions genetic variability. The AMOVA indicated moderated variation within accessions with 30.9 % compared to the variation among accessions, which was 55.5 % of coefficient of variation. The technique of 'amplified fragment length polymorphisms' (AFLP) using six combinations of oligonucleotides amplified 529 bands (457 polymorphic and 72 monomorphic) the respective AMOVA indicated that most genetic variability is also within accessions with 49.7% of the explained variance than among accessions (32.2%). For both techniques analysis Bayesian inference were used for the purpose of determining the least number of populations according to their genetic structure, with which may represent the total of the accessions with SSR method the value $\Delta K = 7$ populations and the AFLP method $\Delta K = 8$ populations. By other hand, to identify genes of resistance to four diseases that affect diseases for Common Bacterial Blight (CBB), Bean Common Mosaic Virus (BCMV), Bean Golden Mosaic Virus (BGMV) and angular leaf spot (ALS) affecting the *Phaseolus* crop we amplified nine SCAR (sequence characterized amplified regions) markers: four linked to resistance to common blight, two for BCMV, two for BGMV and one for ALS. The genetic material were 16 ayocote bean (*P. coccineus*) populations collected from different locations at Veracruz and Puebla, Mexico. Populations from Veracruz showed greater number of SCARs for BGMV and ALS compared with populations from Puebla. The best *P. coccineus* populations were Jalapa, Veracruz and Acultzingo (Veracruz); Nauzontla, and Zacapoaxtla (Puebla). Cluster analysis separated the bean populations evaluated by geographical origin but mainly by the presence of two of the nine amplified markers (SU91 and LG5). The populations studied with emphasis

from those of Veracruz should be used in breeding programs to generate segregating populations with genetic resistance to the major diseases of beans in Mexico, since they showed high frequencies of SCARs.

I. INTRODUCCIÓN

El frijol destaca en el mundo por su importancia socioeconómica, por la superficie destinada para la siembra y la producción en grano (Porch *et al.*, 2013). Según el Comercio Internacional de Alimentos (IFT, 2014) la superficie sembrada y cosechada en primavera-verano 2013 y 2014 en la República Mexicana, incluyendo el área irrigada y de temporal fue de 1,587,813 ha (2013) y 1,484,959 ha (2014) con rendimientos de 0.68 y 0.67 t ha⁻¹, respectivamente. El consumo per cápita en México se ubica en 11 kg (García, 2014). El frijol es un alimento importante para las zonas rurales y poblaciones urbanas de América Latina y África oriental y está ganando importancia en la población de los países desarrollados donde se busca mantener dietas saludables (Acosta-Gallegos *et al.*, 2007). Aunado a lo anterior, la demanda de frijol se ha reducido en aproximadamente 45 % en los últimos 10 años y hoy representa 15 % de los alimentos que consumen los habitantes de las zonas rurales (Guzmán-Maldonado *et al.*, 2007) debido a los cambios en los hábitos alimenticios de la población mexicana en la última década (Reynoso-Camacho *et al.*, 2007).

El frijol (*Phaseolus* spp., Fabaceae) es uno de los alimentos principales de la dieta de la población de México (Broughton *et al.*, 2003). Se reconocen dos centros de origen de *Phaseolus*, uno se ubica en México y el otro en Centroamérica (Kaplan, 1980; Llaca *et al.*, 1994; Santalla *et al.*, 2004a; Delgado-Salinas *et al.*, 2006). La especie más ampliamente estudiada del género es *P. vulgaris*. En los últimos años, en México y en regiones cercanas, se ha reducido la superficie cultivada con asociaciones de maíz debido, entre otros factores, a presiones económicas y factores sociales (Ramírez-Vallejo *et al.*, 2006).

El género *Phaseolus* esta conformado por 150 especies, de las cuales muchas se encuentran en áreas tropicales del continente americano (Giurcă, 2009). En México se han identificado alrededor de 50 especies, y de éstas, sólo cinco se han domesticado: el frijol común (*P. vulgaris* L.), el frijol ayocote ó frijol patol (*P. coccineus* L.), el frijol lima (*P. lunatus* L.), el frijol anual (*P. polyanthus* Greenm) y el frijol tépari (*P. acutifolius* Gray) (Debouck, 1991; Treviño y Rosas, 2013). Después de *P. vulgaris* y *P.*

lunatus, *P. coccineus*, es la tercera especie cultivada más importante de frijol que se cultiva en todo el mundo (Spataro *et al.*, 2011; Porch *et al.*, 2013).

La semilla del frijol común contiene entre 20 y 28% de proteína y sobresale por su abundante faseolina, misma que posee un alto contenido de lisina (1.69 a 2.44%), metionina (0.17 a 0.53%) y triptófano (14.00 a 0.22%). Además, son importantes los contenidos de vitaminas, minerales y fibra (Barrios, 2011; Treviño y Rosas, 2013).

Restos arqueológicos de la forma cultivada de frijol ayocote se han encontrado en Mesoamérica y, particularmente, en México (Vargas-Vázquez *et al.*, 2012). En la República Mexicana el ayocote se cultiva como una planta anual o bianual, en monocultivo y en superficies de 10 a 20 surcos por parcela junto al maíz o al frijol común (Vargas-Vázquez *et al.*, 2011). En México se conserva en condiciones de banco de germoplasma una colección de frijol ayocote compuesta por 800 accesiones, que se clasificaron según las sub-provincias fisiográficas de origen (Vargas-Vázquez *et al.*, 2007). Aunque los restos arqueológicos de *P. coccineus* son escasos, se considera que la domesticación del frijol ayocote ocurrió en las zonas altas y húmedas de México. Esta leguminosa actualmente se cultiva y consume principalmente en los estados de México, Puebla, Tlaxcala e Hidalgo, donde se siembra junto con el maíz (*Zea mays* L.) o el frijol común. En otros estados también se cultiva y consume el frijol ayocote, por ejemplo en las partes altas de Chiapas donde comúnmente se asocia con maíz así como en los estados de Chihuahua, Durango y Zacatecas donde se produce junto al frijol común en condiciones de temporal.

La producción por hectárea de frijol común en México es baja y se debe a que el 87% de la superficie de frijol se cultiva en condiciones de secano (IFT, 2014), por lo que la planta se encuentra expuesta durante su ciclo vital a factores abióticos como la sequía y bióticos como enfermedades. Dado lo anterior, es necesario realizar investigación que permita desarrollar germoplasma de frijol tolerante a enfermedades y otros factores adversos para así aumentar el rendimiento y aprovechar de mejor manera este valioso recurso genético. Además, se deben realizar estudios que demuestren la importancia y los beneficios del consumo de esta leguminosa. Una alternativa es el estudio y

aprovechamiento del frijol ayocote, recurso que cuenta con un gran potencial de aprovechamiento como fuente de resistencia a enfermedades, tolerancia a bajas temperaturas y elevados rendimientos de biomasa y de semilla (Schwartz *et al.*, 2004; Gilmore y Myers, 2004; Gutiérrez-Rodríguez y Escalante-Estrada, 2005; Rodiño *et al.*, 2006). Además, representa una buena alternativa de producción de alimentos en áreas marginales en el Altiplano y los Valles Altos de México (Vargas-Vázquez *et al.*, 2007). La marginación del ayocote pudiera deberse a que los fitomejoradores han dedicado sus esfuerzos a la especie de mayor demanda, el frijol común (Acosta *et al.*, 1991), dejando de utilizar las otras especies de frijol domesticados por los antiguos mexicanos. Estudios sobre diversificación, distribución de germoplasma en territorio mexicano y sus usos serán importantes para maximizar la conservación, uso y aprovechamiento de los recursos genéticos de *P. coccineus* y quizás también para apoyar el mejoramiento genético del frijol común.

II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de *Phaseolus*

2.1.1 Distribución e importancia

La familia Fabaceae ocupa el tercer lugar a nivel mundial en cuanto al número de especies con que cuenta ya que se desarrolla en casi todos los ambientes terrestres y tiende a existir con mayor diversidad en climas estacionales y suelos variados. México ocupa el tercer lugar en cuanto a la representatividad de esta familia, con al menos 135 géneros y 1724 especies. Aunque la distribución de las fabáceas es amplia en el país, gran número de ellas se localiza en regiones tropicales. Los estados del sur tienen la mayor riqueza del género (Mercado-Ruaro, 1998). En México, los estudios arqueológicos evidencian el uso de las leguminosas en la alimentación desde hace más de 4000 años (Zavala-Olalde, 1998).

Las leguminosas juegan un papel importante en las comunidades donde se desarrollan, ya sea como conservadoras de suelo, como abono verde o forraje, en la fijación de nitrógeno o para la producción de semillas para la alimentación humana, por lo cual son de importancia en el país desde el punto de vista económico alimentario, biológico y cultural (Basurto-Peña, 2000). Ello las ha convertido en especies de gran interés para el hombre.

Uno de los grupos más importantes de esta familia en cuanto a su aporte a la alimentación se refiere es la tribu Phaseoleae de la subfamilia Papilionoideae. Esta tribu incluye gran número de géneros de importancia económica entre los que destacan *Glycine*, *Vigna* y *Phaseolus* (Mercado-Ruaro, 1998). Entre éstos destaca *Phaseolus*, que consta de más de 50 especies (Broughton *et al.*, 2003). La importancia del frijol radica en que representa uno de los alimentos de mayor importancia en México ya que junto con el maíz aporta gran cantidad de proteínas vegetales, vitaminas y minerales a la dieta que consumen principalmente los estratos sociales de bajos ingresos de la ciudad y el campo, lo que convierte a esta leguminosa en el grano más importante destinado al consumo directo (Gepts *et al.*, 2008; Muñoz-Saldaña, 2010). Cada 100 g de frijol

contienen 20 g de proteína, 6 de grasa y 3 de fibra (Pérez-Herrera *et al.*, 2002). El valor comercial depende principalmente de características tales como el tamaño, uniformidad de grano y color; así como el tiempo de cocción, el sabor y el espesor del caldo. En cuanto a producción de grano figuran en Latinoamérica Brasil y México como los principales productores (Broughton *et al.*, 2003). Según SAGARPA (2015) en el 2013 el rendimiento promedio nacional de frijol fue de 0.74 ton ha⁻¹.

2.1.2 Descripción taxonómica y botánica.

El nombre del género *Phaseolus* se debe al parecido de la vaina con un pequeño bote (“*phaseolus*”). Este nombre fue asignado por Carlos Linneo en su obra “*Species Plantarum*” en 1753 para un grupo formado por sólo once especies de las cuales cuatro pertenecen actualmente a *Phaseolus* (Zavala-Olalde, 1998). Recientes estudios filogenéticos que incluyen especies silvestres y cultivadas con el uso de datos bioquímicos morfológicos y moleculares han demostrado que el género es monofilético (Broughton *et al.*, 2003). *Phaseolus* se diferencia de otros géneros relacionados por tener los pétalos de la quilla de la flor con un pico espiralado, inflorescencias sin nodos, brácteas florales primarias en su mayoría, persistentes; el follaje y estructuras reproductivas tienen pelos uncinados (en forma de gancho) (Delgado-Salinas *et al.*, 2006). Algunas especies del género se desarrollan por encima de los 3000 msnm (Broughton *et al.*, 2003).

Una especie importante del género es *P. coccineus* L., leguminosa nativa del área de México y Guatemala (Santalla *et al.*, 2004a) y domesticada hace aproximadamente 6,000 años (Souza *et al.*, 1994). La descripción botánica de *P. coccineus* L. se resume en lo siguiente: planta perenne con raíz tuberosa aunque algunas veces bajo cultivo desarrolla raíz fibrosa; ciclo biológico anual; predominantemente alógama con cotiledones principalmente hipógeos y tallos herbáceos; crecimiento indeterminado o determinado con enredadera postrada o trepadora de 1 a 8 m de longitud; segundo par de hojas peciolados, simples, enteras, ovaladas o lanceoladas de 3.5 a 8.0 cm de longitud y de 3.5 cm a 8.0 cm de anchura. Los pecíolos pueden ser glabros o pubescentes de 5 a 12 cm de longitud; hojas trifoliadas con folíolos enteros de forma deltoide o lanceolada,

glabros o pubescentes de 6 a 12 cm de longitud y de 5 a 9 cm de anchura; inflorescencia en forma de racimo más largo que las hojas, de 10 a 60 cm de longitud y con dos o más de 35 entrenudos. En cada nudo nacen dos yemas florales; cáliz gamosépalo, glabro o pubescente de 0.5 a 0.8 cm de longitud; flores de color rojo o morado; el color blanco sólo aparece en variedades cultivadas, pero pueden encontrarse tonalidades intermedias entre el rojo y el blanco; tamaño de las flores de 11 a 30 mm de longitud; nectarios florales principalmente hiperactivos; estigma terminal, capitado u oblicuo, extrorso (dirigido hacia afuera) vainas rugosas glabras o pubescentes cuando verdes que al madurar son de color café, amarillo, pinto o estriado, de 4 a 15 cm de longitud, de 0.5 a 2.5 cm de anchura y de 0.4 a 2.0 cm de espesor. Las semillas son blancas, rojas, amarillas, cafés, negras, moradas, grises, pintas o estriadas; comúnmente son reniformes, cilíndricas, ovaladas o esféricas, con dimensiones que varían de 0.4 a 2.0 cm de longitud, 0.3 a 1.5 cm de anchura y 0.2 a 1.3 cm de espesor (Miranda-Colín, 1990; Freytag y Debouck, 2002).

2.1.3 Usos

Tradicionalmente, el uso principal del frijol ayocote es alimenticio. En Centroamérica el frijol ayocote se cultiva casi exclusivamente en asociación con maíz incluso con frijol común (Vargas-Vázquez *et al.*, 2007); dado que los frijoles son un elemento importante en el autoabasto de las poblaciones rurales es de esperarse una amplia variación en las formas de cultivo, usos y formas de preparación para el consumo (Basurto-Peña, 2000). *P. coccineus* tiene características sobresalientes que podrían aprovecharse en programas de mejoramiento del frijol común, por ejemplo: sistema radicular vigoroso, nudos florales numerosos y pedúnculos largos; resistencia a enfermedades como el virus del mosaico común, virus del mosaico dorado, tizón de halo (*Pseudomonas syringae* Van Mall), tizón común (*Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli* Smith.) (Broughton *et al.*, 2003; Duncan *et al.*, 2006; Márquez *et al.*, 2007) y diversas enfermedades causadas por hongos (*Ascochyta*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium*, *Phaeoisariopsis griseola*, [*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn) (teleomorfo *Glomerella lindemuthiana* Shear)]) (Baudoin *et al.*, 1997; Broughton *et al.*, 2003; Boczkowska *et al.*, 2012); además de poseer cualidades como tratamiento antifúngico contra patógenos como

Botrytis cinerea, *Coprinus comatus*, *F. oxysporum*, *Mycosphaerella arachidicola*, *Phytophthora blight* y *Rhizoctonia solani* (Ngai y Ng, 2004).

A pesar de que en México se encuentra el centro de origen y domesticación de *P. coccineus* (Sicard *et al.*, 2005; Llaca *et al.*, 1994) esta leguminosa se produce y consume principalmente en la región centro y sur del país como los estados de Puebla, México, Tlaxcala, Veracruz, Hidalgo, Querétaro, Michoacán, Oaxaca, Guanajuato, San Luis Potosí y Chiapas (Vargas-Vázquez, 2007). En cambio, en Europa el ayocote llega a sustituir incluso al frijol común en República Checa y Eslovaquia, Polonia, España, Reino Unido, Italia, Holanda, y Hungría (Santalla *et al.*, 2004a), donde se consumen en mayor medida que el frijol común al ser una especie que tolera bajas temperaturas y su producto principalmente se consume en forma de ejote (Rodiño *et al.*, 2006). En las tierras altas de Castilla y León, España, el frijol ayocote se utiliza como semilla de excelente calidad culinaria (Santalla *et al.*, 2004a). Es un cultivo de gran valor comercial por sus cualidades únicas en cuanto a sabor y textura, características por las cuales hacen de esta leguminosa tanto o más competitiva que el frijol común.

A la fecha se han realizado pocos trabajos que comparen germoplasma de *P. coccineus* y de *P. vulgaris* en cuanto a rasgos morfoagronómicos y genéticos útiles en mejoramiento (Acampora *et al.*, 2007). De lo anteriormente descrito se concluye la importancia de estudios con esta especie, tanto en trabajos biosistemáticos como en citogenéticos, poblacionales, reproductivos, de conservación y de diversidad, entre otros (Beebe *et al.*, 2000; Boczkowska *et al.*, 2012).

2.2 Problemática del cultivo de frijol ayocote

El frijol ayocote en México se siembra con variedades nativas o criollas y su cultivo se ha reducido de manera alarmante en los últimos 50 años (Vargas-Vázquez, 2007). Además, el manejo genético de esta especie es algo diferente al del frijol común porque presenta un alto porcentaje de cruzamiento natural (14.7% aproximadamente) (Muruaga *et al.*, 1992), lo que dificulta la conservación de la pureza genética de las variedades criollas pues frecuentemente *P. coccineus* se entrecruza con el frijol común. Sin embargo, se ha observado que las cruza recíprocas en las que se emplea al frijol

ayocote como progenitor femenino no son viables dado que la diferenciación citoplasmática entre *P. coccineus* y *P. vulgaris* provoca la letalidad del embrión híbrido ya que esta proviene del tejido maternal de *P. coccineus*. Puesto que la diferenciación citoplasmática se origina por la presencia de pequeñas barreras en el desarrollo del embrión en el tejido maternal de *P. coccineus* y el núcleo diploide del embrión híbrido tiene la misma constitución cromosómica en las cruzas directas o recíprocas, el núcleo triploide del endospermo difiere entre los cruzamientos recíprocos por la proporción diferente de los genomas parentales (Broughton *et al.*, 2003; Pinchi-Ramírez, 1999).

El frijol ayocote es una especie aún apreciada y consumida por comunidades campesinas ubicadas en zonas de cultivo marginales en tierras altas y ocasionalmente se comercializa en mercados locales. En recientes estudios se ha demostrado que el consumo de esta leguminosa resulta beneficioso para la salud ya que incrementa poco la glucemia postprandial si se compara con el almidón de digestión rápida debido a que el índice glucémico de la leguminosa es bajo y esto contribuye de forma benéfica en el control de la glucemia postprandial y el metabolismo lipídico; por lo que también resulta adecuada en la dieta del diabético y de interés para la disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, en personas con sobrepeso las comidas con bajo índice glucémico aumentan la saciedad y facilitan el control de la ingesta alimentaria (Begoña-Olmedilla *et al.*, 2010).

Muñoz-Saldaña (2010) señala que es importante implicar al sector industrial ya que su participación es del 5% en la producción de presentaciones en polvo o enlatados, por lo que un impulso a la industrialización del frijol podría apoyar la reincorporación plena de esta leguminosa a la dieta del mexicano en beneficio de la salud pública. Por ello, es necesario contar con tecnología de producción que incluya el desarrollo de variedades mejoradas y, así mismo, el manejo agronómico para diferentes condiciones ambientales. Además, es necesario realizar estudios de mercado de la especie para identificar rutas apropiadas para su comercialización, ya que a la fecha tampoco existe información sobre los volúmenes de venta del producto ni de precios al menudeo en los mercados nacionales (Vargas-Vázquez *et al.*, 2007).

2.3 Variedades mejoradas de frijol ayocote en México

Para revertir el fuerte problema al que se enfrentan los agricultores en cuanto a la carencia de materiales genéticos resistentes y con alta productividad, el INIFAP generó la primera variedad mejorada de frijol ayocote en México denominada ‘Blanco Tlaxcala’ (Muruaga, 1996). Dicha variedad es una alternativa al cultivo del frijol común en tierras altas ya que presenta mayor tolerancia a factores abióticos (sequía, bajas temperaturas) y bióticos como las enfermedades causadas por hongos (antracnosis y roya).

2.4 Patrones de diversidad genética en *P. coccineus*

La especie se distribuye tanto en su forma silvestre como cultivada en las regiones altas de la zona centro de México. Cabe mencionar que de las especies cultivadas de *Phaseolus*, el rango de distribución geográfica es importante fuente de variabilidad genética debido a la dispersión natural y artificial producida por el hombre. Por lo tanto, se espera que a mayor dispersión exista también mayor diversidad genética (Vargas-Vázquez *et al.*, 2007). El conocimiento de los patrones de diversidad genética de *P. coccineus* podría incrementar la eficiencia para su conservación, utilización y mejoramiento (Beebe *et al.*, 2000); por lo tanto, la correcta evaluación de la diversidad genética es importante para el adecuado manejo de los recursos genéticos (González *et al.*, 2005) ya que permite emplear de manera objetiva el conjunto de accesiones que integran un banco de germoplasma, que previamente han demostrado contar con características favorables para mejoramiento genético de una variedad en una determinada región del país, ello supone un ahorro de recursos al evitar altos costos de desarrollo de variedades a partir del método tradicional.

2.4.1 Tipos de germoplasma vegetal

Para conservar la diversidad genética vegetal se han creado bancos de germoplasma que contienen grandes cantidades de diversidad genética. Estos bancos incluyen las cinco especies domesticadas de *Phaseolus* y de sus especies silvestres (Gepts *et al.*, 2008). Estas colecciones contienen los recursos fitogenéticos presentes en las especies cultivadas para su conservación a largo plazo y su función es facilitar que

los investigadores, fitomejoradores y otros usuarios puedan acceder a ellos con facilidad. Están formadas por grupos de accesiones representativas de la variación genética, objeto de conservación y/o utilización en el mejoramiento genético. La finalidad de una colección de germoplasma es contar con la mayor representatividad posible de la diversidad genética de una especie reunida en un banco principal y que a su vez pueda contener desde decenas hasta miles de muestras, mantenidas en ambientes y condiciones controladas. Las colecciones de germoplasma se clasifican en base, activa, núcleo y de trabajo (IPGRI, 2000).

La colección base agrupa la variabilidad genética posible de las especies de interés e incluye parientes silvestres, formas intermedias, variedades cultivadas, variedades criollas y germoplasma élite que se establecen para conservar el germoplasma a largo plazo y recuperar las accesiones perdidas (IPGRI, 2000). Puede contener muestras de semilla (ortodoxas únicamente) o material vegetativo a temperaturas de -10 a -20°C (Towil y Roos, 1989). La colección base es estratégica para un país, debe estar duplicada y a cargo de una institución que responda por la supervivencia del germoplasma como un programa nacional o un centro internacional de investigación agrícola. Algunos ejemplos son la colección base de *Arachis* spp. (CENARGEN, Brasil); *Phaseolus* spp. y *Manihot* spp. (CIAT Colombia), *Zea* y *Triticum* (CIMMYT, México).

La colección activa es el duplicado de la colección base y se establece en el corto y mediano plazo (5 a 10 años) para su manejo y distribución. Puede conservar germoplasma en forma de semilla, en campo o *in vitro*. Si conserva semillas éstas se almacenan a temperaturas de 0°C a 15°C (IPGRI, 2000). Si se establece *in vitro*, el material se conserva en condiciones de crecimiento lento. Las colecciones activas están a cargo de instituciones públicas o privadas, que incluyen centros internacionales de investigación; programas nacionales, regionales, provinciales y municipales; universidades y organizaciones no gubernamentales. Dos ejemplos son las colecciones de maíz (CIMMYT, México) y de yuca (CIAT, Colombia).

La colección de trabajo o del mejorador se establece para suministrar germoplasma a investigadores, instituciones y programas de investigación y/o mejoramiento. Contiene accesiones con características de interés para el mejoramiento de un cultivo, aunque no representativas de la variabilidad genética de la especie. Conserva semillas o plantas a corto plazo (hasta 5 años). Las semillas se mantienen a temperatura ambiente pero si el clima es caliente y húmedo se utilizan aires acondicionados y deshumidificadores. Las plantas se conservan en campo o en invernadero. Las colecciones de trabajo normalmente están a cargo de programas de mejoramiento de cultivos.

Comúnmente conocida como 'core collection', la colección núcleo reúne la mayor variabilidad genética de una especie en el menor número de muestras posible; se forma al duplicar la colección base, de la que se separan las accesiones que constituirán la colección núcleo (70-80% de la variabilidad representada en 10-15% de las accesiones); el resto se mantiene en una colección de reserva. La colección núcleo se establece para facilitar el manejo y fomento del uso del germoplasma. También permite detectar duplicados en la colección base y establecer prioridades para caracterizar y evaluar las muestras; además, ofrece el fácil acceso a los materiales conservados (IPGRI, 2000). La colección núcleo conserva semilla o material vegetativo en las mismas condiciones que una colección activa. Al igual que las dos anteriores, está a cargo de centros internacionales, programas nacionales o programas colaborativos de cultivos específicos, entre otros. Una colección núcleo puede analizarse por diversos métodos, tanto morfológicos (tamaño de la semilla, color, forma, peso, aspecto de la hoja, color de los cotiledones o del tallo) o moleculares (RAPDs, RFLPs, AFLPs, entre otros). Dichos estudios permiten el diagnóstico de la colección y análisis del estado del conocimiento del germoplasma en cuanto a distribución y diversidad presente en la especie en un país, todo ello para un mejor aprovechamiento y utilización del germoplasma (Vargas-Vázquez *et al.*, 2007).

2.4.2 Germoplasma de *P. coccineus*

Actualmente el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) cuenta con una colección nacional de frijol ayocote de la forma cultivada, constituida por 800 accesiones que contienen datos de información geográfica del origen de cada una de las accesiones que la conforman así como datos de entidad federativa y rango altitudinal, provincia y subprovincia fisiográfica, tipo de suelo, tipo de clima y tipo de vegetación. Vargas-Vázquez (2012) realizó un diagnóstico de dicha colección de ayocote y concluyó que la subprovincia fisiográfica más representada en la colección es la llamada ‘Lagos y Volcanes del Anáhuac’ que pertenece a la provincia ‘Eje Volcánico’. El estado o entidad federativa con mayor número de colectas es Puebla y los estados menos representados son Chiapas, Hidalgo y San Luis Potosí. Ello sugiere llevar a cabo más recorridos de colecta para tener mayor representatividad de esas entidades federativas. El tipo de suelo más común en los sitios de colecta fue el Cambisol Éutrico (rico en materia orgánica) que representa más del 50% de lo encontrado en esta colección. Las características de suelo, clima y vegetación de algunos sitios excepcionales podrían permitir una selección previa de colectas con probable tolerancia a suelos ácidos, bajas temperaturas en sitios muy altos, déficit hídrico, y desarrollo en suelos poco profundos.

2.5 Estudios morfoagronómicos y de diversidad en *P. coccineus*

En México pocos trabajos se han realizado con *P. coccineus*. Por ejemplo, la caracterización morfológica de 42 poblaciones de frijol ayocote y 107 de frijol común del estado de México indicó que existe mayor diversidad en *P. vulgaris* que en *P. coccineus* y que dicha diversidad podría deberse al intercambio de semillas en los mercados regionales y por su utilización en los sistemas de asociación maíz-frijol (Ramírez-Vallejo *et al.*, 2006). Basurto-Peña (2000) realizó un estudio etnobotánico con *P. coccineus* L. y *P. polyanthus* Greenman para determinar la diversidad genética en ambas especies originarias del norte del estado de Puebla, entre los 1400 y 1800 msnm (municipios de Nauzontla, Xochitlán, Zacatlán y Ahuacatlán) y reportó la presencia y distribución de ambas especies cultivadas, escapadas de cultivo y especies silvestres.

El frijol ayocote se ha utilizado como cultivo de cobertura en áreas que presentan ligeros niveles de erosión. Navarro-Garza *et al.* (2007) compararon la aptitud de cobertura vegetal de suelo y las principales características agronómicas de cinco especies vegetales establecidas en Nonalco e Ixcayoc, Estado de México. Las especies fueron frijol ayocote, dos variedades de haba (*Vicia faba* var. ‘Purépecha’ y ‘V-35’), veza (*Vicia sativa*) y avena (*Avena sativa*). La mejor cobertura (98 % en Ixcayoc y 95 % en Nonalco) la mostraron avena y veza, pero en Nonalco el frijol ayocote tuvo un comportamiento similar al exhibido por avena y veza. El haba ‘Purépecha’ mostró el menor crecimiento en ambos sitios. Por otro lado Sangabriel *et al.* (2007) evaluaron la tolerancia y el crecimiento de tres especies de leguminosas (*Clitoria ternatea*, *P. coccineus*, *Cicer arietinum*) en suelo contaminado con combustóleo, así como su capacidad para reducir el contenido de hidrocarburos provenientes del mismo. *P. coccineus* fue la única leguminosa con tolerancia al suelo contaminado pues presentó una población microbiana en la rizósfera mayor a las otras dos especies. También, Reynoso-Camacho *et al.* (2007) evaluaron cuatro variedades de frijol común de los tipos con mayor demanda en México (Pinto Zapata, Flor de Mayo Anita, Flor de Junio Marcela y Blanco Tlaxcala) por su capacidad para reducir el cáncer de colon en rata (*Rattus* spp.) Sprague-Dawley se cuantificó el contenido de taninos, antocianinas, azúcares solubles y compuestos fenólicos en harinas de frijol cocido. La incidencia de lesiones en forma de placas fue mayor en la parte distal del colon en ratas alimentadas con las variedades Pinto Zapata y Flor de Mayo Anita; las alimentadas con frijol Blanco Tlaxcala (*P. coccineus*) (0.30 100 g⁻¹ de alimento) y Flor de Junio Marcela (75 100 g⁻¹ de alimento) mostraron mayor incidencia de placas en la parte media y proximal del colon y disminuyeron entre 10 y 12% la carcinogénesis del colon. A pesar de las diferencias en la composición química de las variedades de frijol, no hubo relación entre los compuestos estudiados y la incidencia del cáncer de colon. Por su parte, Ayala-Garay *et al.* (2006) evaluaron el rendimiento y la calidad de semilla de nueve variedades de frijol ayocote cultivadas en dos fechas de siembra en Montecillo, México. La calidad fisiológica se determinó con base en el vigor de la semilla después de someterla a envejecimiento acelerado a una temperatura de 42° C y alta humedad relativa durante 120 h. El rendimiento de grano en la primer fecha de siembra (529 g planta⁻¹) fue

superior al de la segunda (334 g planta⁻¹). En la primera fecha se obtuvo el mayor rendimiento y calidad física de la semilla y en la segunda se produjo semilla con mayor calidad fisiológica debido a que en esta fecha hubo menor exposición al ambiente adverso debido a que tuvo ciclo biológico más corto. Ello llevó a recomendar las siembras tempranas y las cosechas rápidas después de la madurez para obtener semilla de frijol ayocote con alta calidad y vigor. Otro trabajo es el de Escalante-Estrada *et al.* (2005) quienes determinaron la relación entre el crecimiento, biomasa y rendimiento de la semilla de tres variedades de frijol común (Bayomex, Criollo y Canario 107) y una de ayocote con hábito de crecimiento indeterminado. Ambas especies se cultivaron en suelos salinos y mostraron diferencias en los días a floración y madurez fisiológica; el rendimiento de semilla fue de 132, 179, 86 y 41 g m⁻² y el de biomasa de 371, 353, 260 y 206 g m⁻² para el frijol ayocote y las variedades Bayomex, Criollo y Canario 107, respectivamente. No hubo relación entre el rendimiento de la semilla y la cantidad de biomasa. Zavala-Olalde (1998) comparó la fenología, morfología, crecimiento y rendimiento de tres variedades de *P. vulgaris* (P. Villa, Bayomex y Bayo Mecentral) y una variedad de *P. coccineus* (Blanco Tlaxcala). Blanco Tlaxcala floreció de 4 a 12 días antes que *P. vulgaris* pero presentó ciclo de cultivo más largo (36 días más que *P. vulgaris*); ésta variedad presentó ciclo de cultivo más largo (135 días), 36 días más que las variedades de *P. vulgaris*. Blanco Tlaxcala presentó una tasa de asimilación neta (0.813 g m⁻² día) menor que la de *P. vulgaris* (2.135 g m⁻² día) y los valores de Índice de Área Foliar (IAF) y Duración de Área Foliar (DAF) fueron de cuatro a siete veces menores para ‘Blanco Tlaxcala’ en comparación con el frijol común. Por su parte, Vargas-Vázquez e Irizar-Garza (2004) quienes analizaron el efecto de un regulador del crecimiento del tipo brasinoesteroide en la acumulación de materia seca y el rendimiento de grano de la variedad de frijol ayocote Blanco Tlaxcala en condiciones de temporal en Tetelco, México. El brasinoesteroide incrementó la biomasa total con rendimiento de grano mayor a 68 % en la densidad de 90 mil plantas ha⁻¹ respecto a la producción en la misma densidad sin brasinoesteroide.

Vargas-Vázquez *et al.* (2012) elaboraron mapas de distribución geográfica de 798 accesiones de ayocote a partir de la colección núcleo del INIFAP obtuvieron que los climas más representados fueron los templados húmedos y semiáridos, asociados en su

mayoría al bosque mixto de pino-encino en suelo cambisol éutrico. También Vargas-Vázquez *et al.* (2013) registraron los datos de pasaporte, localidad, estado, altitud, coordenadas geográficas, temperaturas máxima, mínima y media anual de 798 accesiones de frijol ayocote sus resultados indicaron que el total de las accesiones se domesticaron en 140 sitios de 13 estados del territorio nacional, de ellas 80% se encontraron en altitudes de 1,500 a 2,500 msnm con una precipitación de 500 a 1,000 mm anuales. Un amplio rango de temperatura mínima y temperatura máxima separó los sitios en: muy fríos, de -5 a 1 °C en la noche y de 21 a 31 °C en el día; fríos de 3 a 5 °C en la noche y de 25 a 33 °C en el día; y semifríos de 6 a 9 °C en la noche y de 25 a 37 °C en el día. La distribución de variedades criollas de la especie se concentra sobre todo en zonas altas y húmedas del territorio nacional, aunque también se adapta a zonas semiáridas con poca precipitación y muy cálidas.

2.6 Análisis genéticos en *Phaseolus*

En México pocos son los trabajos asociados con el uso de técnicas de marcadores moleculares en *P. coccineus*. Uno de ellos es el realizado por Ruíz-Salazar *et al.* (2010a) quienes analizaron morfológica y molecularmente germoplasma de frijol ayocote de la Región Carso Huasteco de Puebla, con base en 25 descriptores morfológicos, de los cuales 14 resultaron altamente explicativos y pudieron diferenciar al germoplasma en dos grupos con base en el color y el tamaño de la semilla así como la longitud del racimo. Mediante un análisis de conglomerados se agrupó al germoplasma de las localidades de Zacapoaxtla y Mercado de Zacapoaxtla con el de Chignahuapan; así como el de Tlatlauquitepec y Mercado de Tlatlauquitepec con Nauzontla. El análisis AFLP indicó un polimorfismo genético mayor a 87.4 % y el análisis de la varianza molecular indicó alta diferenciación genética en el germoplasma. Las accesiones con mayores índices de diversidad (ID) fueron las del Mercado de Zacapoaxtla (56.8 %) y Ahuacatlán (50.5 %), mientras que las de Chignahuapan presentaron menores IDs (39.6%). El análisis de conglomerados con base en datos AFLP indicó que el germoplasma de frijol ayocote del Carso Huasteco es ampliamente diverso pues no se observaron agrupamientos claros con base en el origen. En Europa se han evaluado rasgos de la semilla asociados con marcadores moleculares tales como RAPD (“ADN

Polimórfico Amplificado al Azar”), ISSR (“Inter Secuencias Simples Repetidas”), ET (“Orientación de Exón”) e IT (“Orientación de Intrón”) y se ha diferenciado germoplasma de *P. coccineus* con base en sus rasgos morfológicos y moleculares, los ISSR mostraron el mayor poder discriminante del germoplasma (Acampora *et al.*, 2007). En Italia se comparó la diversidad genética en frijol ayocote y frijol común con marcadores microsatélites en ADN se concluyó que el frijol común de Italia pertenece al acervo genético Andino mientras que el ayocote al Mesoamericano (Sicard *et al.*, 2005). Asimismo Negri y Tosti (2002) evaluaron la diversidad genética de 31 variedades criollas de *P. vulgaris* y cinco de *P. coccineus* de la región central de Italia mediante la técnica AFLP y detectaron niveles de polimorfismo mayores a 90.2% así como amplia variación genética en el germoplasma colectado. Las variedades criollas fueron discriminadas en dos grupos principales uno conformado por accesiones de la región del Mediterráneo y el otro con accesiones de la región del Mediterráneo húmedo dentro de los montes Apeninos. Esos resultados demostraron la identidad genética de esas variedades criollas y como están relacionadas con la presión de selección tanto humana como ambiental. En España se estudiaron 24 variedades de frijol ayocote con base en características útiles para el mejoramiento (suavidad, dureza de la testa, integridad del grano, rendimiento de semilla, peso y tamaño de la semilla absorción de agua) nueve variedades exhibieron alta calidad de semilla tanto para características morfoagronómicas como organolépticas (Martínez *et al.*, 2002). También en España se estudio la variación genética entre variedades criollas de frijol común (15 variedades) y frijol ayocote (6) con isoenzimas y RAPDs, las isoenzimas revelaron variabilidad genética entre y dentro de variedades de ambas especies. Las variedades criollas españolas tienen menores niveles diversidad genética que los materiales silvestres Americanos y probablemente también niveles más bajos que las variedades criollas Americanas. El análisis RAPD permitió distinguir a todas las variedades criollas de las silvestres. La similitud genética entre las variedades criollas, ambas estimadas por isoenzimas y RAPDs, no se relacionaron con los caracteres morfológicos de la semilla (color tamaño y forma) que definieron y diferenciaron a cada variedad (Alvarez *et al.*, 1998). Por su parte Spataro *et al.* (2011) señalan que *P. coccineus* es una especie cercanamente relacionada a *P. vulgaris* y es la tercera especie cultivada mas importante

del género *Phaseolus* pero también mencionan que poco se sabe de sus patrones de diversidad genética por lo analizaron la diversidad genética y estructura de una colección mundial de ayocote 28 formas silvestres y 52 cultivadas de Mesoamérica (considerado centro de domesticación), además de 148 accesiones cultivadas de Europa (donde se introdujo el cultivo en el siglo XVI). Para el estudio de esta colección se emplearon 12 marcadores SSR que fueron desarrollados para el genoma de *P. vulgaris*, pero que probaron ser efectivos en ayocote, los resultados indicaron diferenciaron claramente los acervos europeos y Mesoamericano, se observó reducción genética en *P. coccineus* al ser introducido a Europa, tanto las variedades cultivadas como las silvestres de Mesoamérica comparten un alto flujo genético. Por otra parte, Boczkowska *et al.* (2012) mencionan que analizaron 152 accesiones de *P. coccineus* de las cuales 68% provienen de Polonia, 17% de Ucrania y 10% de Eslovaquia con cinco combinaciones de primers AFLP selectivos, con lo que obtuvieron 98.4% de bandas polimórficas, sin embargo 22.8% de las bandas son comunes a todas sus accesiones por lo que sus resultados indican también reducida variabilidad genética en sus accesiones de ayocote lo que a su vez concuerda con lo reportado por Spataro *et al.* (2011). En Italia Catarcione *et al.* (2013) estudiaron la estructura genética entre y dentro de poblaciones de una variedad de ayocote llamada ‘Fagiolone’ (frijol grande) con 12 marcadores SSR de origen genómico sus resultados indican que la variedad constituye una población genéticamente estructurada y mantiene un nivel significativo intrapoblacional. También en Italia Rodriguez *et al.* (2013) analizaron 331 accesiones de ayocote cultivado provenientes de los países de Albania, Austria, Bulgaria, Croacia, Georgia, Alemania, Hungría, Italia, Moldavia, Polonia, Portugal, Eslovaquia, Eslovenia Holanda, Rumania, España y Ucrania, ellos emplearon seis microsatelites de cloroplasto (cpSSRs) y 12 microsátélites de origen nuclear nuSSRs, para explorar la diversidad genética de las accesiones anteriormente señaladas, además emplearon como accesiones de referencia variedades botánicas de *P. coccineus* var. *albiflorus*, *P. coccineus* var. *bicolor* *P. coccineus* var. *coccineus* y 49 accesiones cultivadas y silvestres de Mesoamérica, ellos infieren la existencia de un moderado a fuerte cuello de botella respecto a la diversidad genética y posterior expansión del cultivo en Europa, en cuanto al análisis de las variedades botánicas *albiflorus*, *bicolor* y *coccineus*, el cual solamente se basó en el

color de flor, no pudo ser distinguido de acuerdo a los marcadores cpSSRs y nuSSRs no se encontró relación con los rasgos cuantitativos evaluados. En Polonia Nowosielski *et al.* (2002) analizaron cinco accesiones de *P. coccineus* y 29 accesiones de *P. vulgaris* mediante RAPD y AFLP, sus resultados claramente diferenciaron las accesiones de *P. coccineus* de *P. vulgaris* indicando que cada una de las técnicas moleculares distinguen de manera única a las especies de *Phaseolus*. Por su parte Mercati *et al.* (2015) mencionan que las variedades tradicionales (criollas) deben ser consideradas como fuentes valiosas de germoplasma ya que puede contribuir a las actividades de mejoramiento genético del frijol por ejemplo, para enfrentar al cambio climático así como para satisfacer los requerimientos de las nuevas variedades desarrolladas para áreas marginadas, también mencionan que el frijol ayocote es de las principales especies de *Phaseolus* cultivadas a nivel mundial, pero, muy pocos estudios han sido desarrollados para evaluar la diversidad genética y estructura dentro y entre las poblaciones criollas por lo que evaluaron 20 diferentes poblaciones tradicionales de ayocote del centro de Italia de la variedad llamada ‘Fagiolone’ junto con 41 accesiones de Italia y Mesoamérica a partir de 14 SSRs, para establecer su estructura genética y pertenencia, sus resultados indican que la variedad ‘Fagiolone’ puede ser considerada como una población dinámicamente envuelta con polinización abierta, que muestra un nivel significativo de variación genética, principalmente detectado dentro de poblaciones, los análisis filogenéticos y de estructura poblacional indican que las accesiones Mesoamericanas y las variedades Italianas pertenecen a dos distintos acervos genéticos lo que confirma la hipótesis de que Europa puede ser considerado centro de diversificación secundario de *P. coccineus*.

Ruíz-Salazar *et al.* (2010b) buscaron secuencias tipo SCAR asociadas con la resistencia a dos patógenos importantes del frijol los cuales fueron tizón común *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) y antracnosis, *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn). Las secuencias más frecuentemente amplificadas fueron SAS13 y SBB14 para resistencia a antracnosis y para tizón común BAC6 y SU91. Las accesiones con hasta cinco SCAR incluyeron materiales precoces y tardíos a floración y madurez fisiológica así como diferentes colores de testa, tamaño de vaina y de semilla.

2.7 Uso de Selección Asistida por Marcadores Moleculares (SAMM) en el mejoramiento de la resistencia genética a enfermedades en *Phaseolus*.

La detección de genes que confieren resistencia a enfermedades puede realizarse mediante el uso de marcadores moleculares (Mienie *et al.*, 2005). De éstos, cabe señalar los SCARs ('sequence-characterized amplified regions'), son un tipo de marcador que amplifica secuencias ligadas a genes de resistencia y que, por lo general, co-segrega junto al gen de interés ya que la distancia genética entre el SCAR y el gen de resistencia generalmente no sobrepasa los 5 cM (Kelly *et al.*, 2003).

De las enfermedades virales que afectan a las especies cultivadas de frijol, dos son transmitidas por áfidos: el virus del mosaico común del frijol (BCMV) y el virus del mosaico dorado del frijol (BGMV). El BCMV disminuye el rendimiento hasta en 80% dependiendo de la variedad, del estado de desarrollo en que se encuentren las plantas y las condiciones ambientales al momento de la infección (Castro *et al.*, 2001). El BGMV afecta significativamente la producción del frijol convirtiéndose, en la mayor limitante para su cultivo en zonas bajas e intermedias de las regiones tropicales y subtropicales de América (Rosas, 1998). Rodríguez *et al.*, (2007) identificaron el marcador *bgm-1* que confiere resistencia al BGMV en líneas y variedades seleccionadas con buen comportamiento en campo. Por otro lado, Garrido-Ramírez *et al.* (2000) estudiaron la composición nucleotídica del BGMV y, además, detectaron germoplasma originario de Mesoamérica resistente al virus. Para el caso de Mancha Angular (MA) [*Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr.], Mahuku *et al.* (2004) señalan que provoca pérdidas del 50 al 80% en rendimiento de frijol al sembrar variedades susceptibles. Por su parte, la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterin, que provoca el tizón común (TC), reduce el rendimiento de grano del frijol del 22 al 45% (Fourie *et al.*, 2011).

En México solo se ha desarrollado una variedad mejorada de *P. coccineus* (Blanco Tlaxcala) (Vargas-Vázquez, 2001), y en general, esta especie tiene atributos agronómicos ventajosos tales como la tolerancia al frío, resistencia a pudriciones de raíz, presencia de raíces tuberosas que le permiten el desarrollo con ciclo perenne, grandes

racimos de vainas, gran número de vainas por inflorescencia; resistencia a enfermedades como el moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum*) (Terán y Singh, 2005) y mustia hilachosa (*Rhizoctonia solani*) (González-Martínez *et al.*, 2005). También, la introgresión de la resistencia a *Xanthomonas* spp., *Fusarium* spp. y *Ascochyta* spp. de *P. coccineus* a *P. vulgaris* ha sido exitosa (Santalla *et al.*, 2004b). Los niveles relativamente altos de polinización cruzada en frijol ayocote son una fuente de variabilidad para algunos rasgos y para el mejoramiento genético del frijol común (Singh, 2001) así como para superar problemas de producción donde se han llevado a cabo trabajos de hibridación interespecífica entre las dos especies (Silue *et al.*, 2005). A pesar de lo anterior, el potencial de aprovechamiento del frijol ayocote con propósitos de mejoramiento no ha sido suficientemente evaluado y empleado para el desarrollo de líneas interespecíficas mejoradas; por lo que actualmente, los logros en el mejoramiento del frijol común basado en el uso y aprovechamiento de *P. coccineus* son escasos (Santalla *et al.*, 2004b).

III. JUSTIFICACIÓN

El frijol ayocote (*P. coccineus*) es una leguminosa originaria de México, que a pesar de su importancia en la alimentación humana, ha sido poco estudiada tanto para conocer la estructura genética de sus poblaciones naturales como en cuanto a los posibles beneficios que ésta pueda aportar para su propio mejoramiento y para el de otras especies afines. Por ello, es necesario continuar trabajando en el mejoramiento del conocimiento relativo a los patrones de diversidad genética que presenta esta especie dado que, a pesar de que se encuentra ampliamente distribuida en México, poco es lo que se conoce de ella. La determinación del grado y patrones de diversidad genética que presenta el germoplasma de *P. coccineus* en México permitirá conocer el potencial genético y la riqueza que representa este cultivo para el país y, con ello, poder proponer a los programas de mejoramiento genético de *Phaseolus* aquellos individuos que posean características deseables y potencialmente puedan contribuir a la producción de germoplasma mejorado.

Una opción es realizar la selección a partir de marcadores moleculares que básicamente consiste en la búsqueda de marcadores ligados a una región génica fenotípicamente caracterizada en la que la expresión fenotípica de la misma ocupa un segundo plano. De esta forma, la identificación de un fenotipo se reduce a la presencia o ausencia de uno o más marcadores moleculares.

Los pocos estudios que a la fecha se han realizado en frijol ayocote han demostrado que esta especie cuenta con resistencia a diversas enfermedades virales, fúngicas y bacterianas. También se ha demostrado que cuenta con resistencia a factores adversos como la salinidad y las bajas temperaturas. Por otra parte, también se han llevado a cabo estudios para conocer sus propiedades organolépticas obteniéndose buenos resultados.

Por tanto, resulta importante primeramente caracterizar y conocer la diversidad genética de esta especie, ya que ello repercutirá en gran medida en el interés por parte de los fitomejoradores ya sea para el mejoramiento genético de la especie o de otros parientes cercanos tales como el frijol común.

Por todo lo mencionado, resulta de gran interés generar el conocimiento de los patrones de diversidad genética de *P. coccineus* particularmente en el estado de Veracruz, México ya que actualmente se cuenta con una buena representatividad de la especie en dicho estado. Ello generará la información necesaria para tener una perspectiva amplia de la estructura genética de las poblaciones de frijol ayocote y, con ello, impulsar estrategias de conservación, manejo y aprovechamiento de ese recurso genético. Con lo anterior se puede determinar las relaciones genéticas del ayocote Veracruzano con germoplasma de otras provincias fisiográficas lo cual permitirá conocer si estas comparten o no un origen genético y geográfico común además de su grado de parentesco. También, la detección de genes asociados con la resistencia a enfermedades de importancia económica ofrece una opción adicional al mejoramiento de *Phaseolus*. La determinación de los patrones de diversidad genética presentes en el germoplasma de frijol ayocote de Veracruz ofrecerá un panorama amplio sobre las rutas de dispersión de esas poblaciones con respecto a accesiones provenientes de otros estados de la república.

IV. HIPÓTESIS

Existe amplia diversidad genética en las accesiones de *P. coccineus* del estado de Veracruz y estas pueden diferenciarse del resto del germoplasma correspondiente a otros estados de México

El germoplasma de ayocote presenta resistencia a enfermedades como lo son: tizón común, virus del mosaico dorado, mancha angular y virus del mosaico común del frijol.

V. OBJETIVOS

5.1 General

Determinar la diversidad genética presente en germoplasma de frijol ayocote (*P. coccineus*) originario de Veracruz, México y establecer las relaciones genéticas con germoplasma de la misma especie de otras regiones de México.

5.2 Específicos

Analizar, con marcadores moleculares AFLP y SSR, 106 accesiones de frijol ayocote originarias del estado de Veracruz y 58 accesiones del resto del país y determinar sus patrones de diversidad genética.

Detectar la presencia de secuencias SCAR asociadas con genes de resistencia a enfermedades de importancia económica en el estado de Veracruz (tizón común, virus del mosaico dorado, mancha angular y virus del mosaico común del frijol).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional en Reynosa, Tamaulipas de 2010 a 2013 y consistió en analizar la diversidad genética (con los marcadores moleculares AFLP y SSR) y en detectar secuencias SCAR asociadas con la resistencia a cuatro enfermedades (tizón común, virus del mosaico dorado, mancha angular y virus del mosaico común del frijol) en 107 accesiones de *P. coccineus* originarias de diversas localidades del estado de Veracruz y 57 de otras regiones de México (Cuadro 1; Fig. 1) (Vargas-Vázquez, 2007). Para lo anterior, se colectaron de cuatro a cinco gramos de tejido foliar joven de cada accesión y se procedió a la extracción y análisis del ADN por los métodos moleculares anteriormente mencionados.

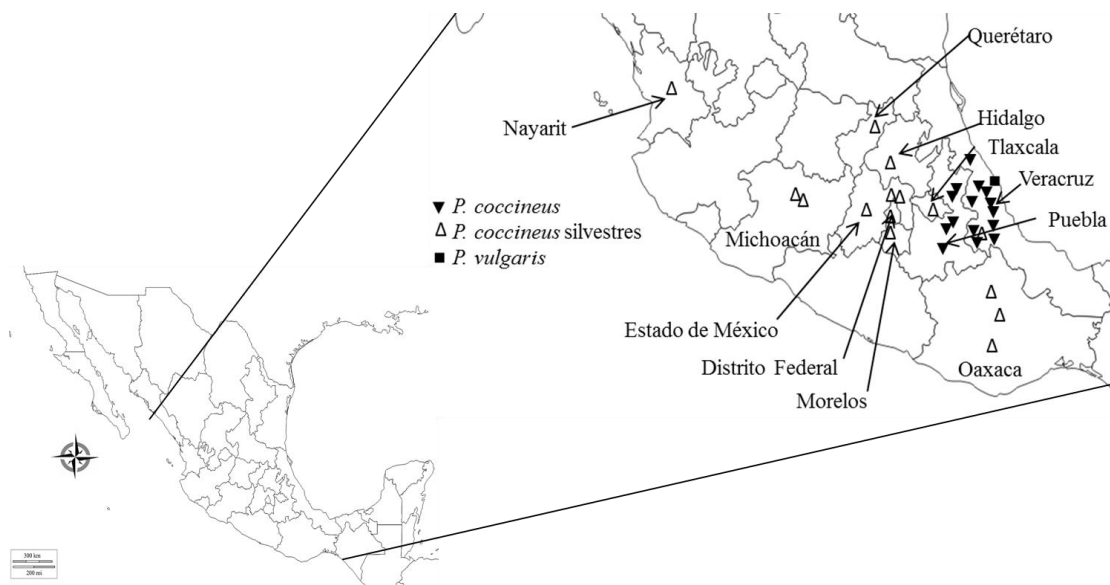


Fig 1. Distribución geográfica de los sitios de colecta de las accesiones silvestres de los estados de Morelos, Querétaro, Tlaxcala, Hidalgo, Nayarit, Oaxaca, Distrito Federal, Estado de México y Michoacán y cultivadas de *Phaseolus* de Puebla y Veracruz.

Cuadro 1. Localidades de las accesiones de *P. coccineus* empleadas en el análisis de la diversidad genética.

<i>P. coccineus</i> de Veracruz	[¶] No.	[*] LN	[§] LO	[€] msnm	Tipo vegetación	<i>P. coccineus</i> de Puebla	No.	LN	LO	msnm	Tipo vegetación
Acultzingo	20	18°45'0"	97°13'48"	2320	^b A	Chignahuapan	1	19°49'48"	98°3'0"	2260	C
Altotonga	15	19°46'12"	97°15'0"	2000	A	M. Tlatlauquitepec	1	19°52'12"	97°28'48"	2025	A
Jalapa	29	19°31'48"	96°55'12"	1460	[€] B	Ávila Castillo	1	19°51'0"	97°27'0"	1860	A
C. Mendoza	6	18°48'0"	97°10'12"	1340	A	M. Serdán	3	18°58'48"	97°27'0"	2676	C
Jalacingo	3	19°48'0"	97°18'0"	1880	A	M. Zacapoaxtla	6	19°52'48"	97°34'48"	2045	A
Perote	5	19°34'12"	97°13'48"	2390	^λ C	Nauzontla	3	19°58'12"	97°36'0"	1400	B
Veracruz	29	19°31'48"	96°55'12"	1460	B	Tlatlauquitepec	5	19°52'12"	97°28'48"	2025	A
						Zacapoaxtla	10	19°52'48"	97°34'48"	2045	A
Silvestres											
<i>P. coccineus</i>											
Tlaxcala	1	19°18'36"	98°12'0"	1050	C	Testigos					
Morelos	1	19°1'48"	99°15'36"	2300	D	P. Villa	1				
Veracruz	1	1839'36"	96°58'48"	1800	C	BAT 477	1				
Estado de México	2	19°3'0"	100°1'48"	1800	D	Pinto UI 114	1				
Estado de México	1	19°27'0"	99°13'48"	2600	C	<i>P. glabellus</i>	1				
Distrito Federal	1	19°36'36"	99°12'0"	2500	C	<i>P. lunatus</i>	1				
Oaxaca	1	16°55'48"	96°54'0"	2600	[†] D	<i>P. vulgaris</i>	7				
Oaxaca	1	17°21'36"	96°31'48"	2039	D	(Veracruz)					
Oaxaca	1	17°49'48"	96°12'0"	420	D						
Nayarit	1	21°30'36"	104°52'48"	1860	A						
Michoacán	1	19°28'48"	101°19'48"	2110	A						
Michoacán	1	19°40'48"	101°57'36"	2100	A						
Querétaro	1	21°9'0"	99°9'0"	2450	C						
Hidalgo	1	19°57'36"	98°30'36"	2320	[◊] E						

[¶]No = Número de accesiones; ^{*}LN = Latitud Norte; [§]LO = Longitud Oeste; [€]msnm = metros sobre el nivel del mar; ^bA = Bosque mixto de *Pinus-Quercus*; [€]B = Bosque de niebla con latifoliadas deciduas; ^λC = Vegetación semidesértica con arbustos latifoliados siempre verdes y latifoliadas deciduas con predominancia de *Agave lechuguilla*; [†]D = Bosque de latifoliadas deciduas con árboles menores a 15 m (100% de deciduas); [◊]E = Sabana arbustiva con latifoliadas con predominancia de estrato herbáceo.

VII. RESULTADOS (ARTÍCULOS)

Los resultados son presentados a manera de artículo científico, con título y autores como se señalan a continuación:

- 7.1. Ruíz-Salazar, R., N. Mayek-Pérez, y P. Vargas-Vázquez. 2015. Diversidad morfoagronómica y recursos genéticos del frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) en México. Artículo de revisión enviado a Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences.
- 7.2. Ruíz-Salazar, R., M.L.P. Vargas-Vázquez, J.S. Muruaga-Martínez, S. Hernández-Delgado, G. Alexandre-Iturbide, N. Almaraz-Abarca & N. Mayek-Pérez. Analysis of Genetic Variability and Genetic Relationships of Ayocote Beans from México. Artículo de investigación (en proceso de enviar al Journal of Botanical Science)
- 7.3. Ruíz-Salazar, R., J.S. Muruaga-Martínez, M.L.P. Vargas-Vázquez, G. Alexandre-Iturbide, G. Castañón-Nájera, S. Hernández-Delgado, N. Almaraz-Abarca, y N. Mayek-Pérez. 2016. Marcadores moleculares SCAR para identificar fuentes de resistencia a enfermedades en frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*). Trabajo aceptado en *Phyton International Journal of Experimental Botany*.

7.1. Artículo de revisión: Ruíz-Salazar, R., N. Mayek-Pérez, y P. Vargas-Vázquez. 2015. Diversidad morfoagronómica y recursos genéticos del frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) en México.

Trabajo enviado a la revista Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences

.

**DIVERSIDAD MORFOAGRONÓMICA Y RECURSOS GENÉTICOS DEL
FRIJOL AYOCOTE (*Phaseolus coccineus* L.) EN MÉXICO**

GENETIC RESOURCES OF RUNNER BEAN (*Phaseolus coccineus* L.) IN MEXICO

Régulo Ruíz S.^{1*}, Netzahualcoyotl Mayek P.¹, y Patricia Vargas V.²

¹ Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Boulevard del Maestro Esq. Elias Piña S/N, Col. Narciso Mendoza, 88710, Reynosa, Tamaulipas, México. Tel/Fax +52 (834) 301 33 60.

² Programa de Recursos Genéticos, Campo Experimental Valle de México, INIFAP, Carretera Los Reyes-Texcoco, km 13.5. A. P. 307. C. P. 56250, Coatlinchán, Texcoco, Estado de México.

* Autor para correspondencia E-mail: rruizs0700@colpos.mx

Título abreviado: Diversidad morfoagronómica y genética del frijol ayocote.

RESUMEN

Este trabajo analiza algunos aspectos del frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) Mexicano entre los que destacan su distribución geográfica, y patrones de diversidad morfoagronómica y genética. Los estudios del ADN cloroplástico sugieren que el centro de origen del frijol ayocote se localiza en la región de Tehuacán, Puebla, México, aunque también hay vestigios importantes en Guatemala y Honduras. Actualmente, el frijol se distribuye en América desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina. En Italia y España *P. coccineus* ha contribuido al mejoramiento genético del frijol común (*P. vulgaris*) mediante la introgresión de resistencia genética a enfermedades como el moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum*), y tizón común (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*). También tiene características tales como resistencia a bajas temperaturas, enfermedades y sequía, por lo que se sugiere desarrollar investigación que permita caracterizar la resistencia genética de *P. coccineus*

presente en México para generar variedades mejoradas de frijol común con características favorables presentes en *P. coccineus* L.

Palabras clave: mejoramiento genético, marcadores moleculares, patógenos, resistencia.

ABSTRACT

This paper analyzes some aspects of Mexican runner bean (*Phaseolus coccineus* L.) like its geographic distribution, morpho agronomic patterns and genetic diversity. Chloroplast DNA studies suggest that the center of origin of runner bean is located in Tehuacan, Puebla, Mexico although there are important remains in Guatemala and Honduras. Currently, the beans are distributed in America from the southern United States to northern Argentina. In Italy and Spain *P. coccineus* has contributed to breeding of common bean (*P. vulgaris* L.) by introgression of genetic resistance to diseases like white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*), and common blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*), also has characteristics such as resistance to low temperatures, disease and drought so it is suggested to develop research to characterize the genetic resistance of *P. coccineus* L. present from Mexico to generate improved common bean with favorable traits present in *P. coccineus* varieties.

Key words: breeding, molecular markers, pathogens, resistance.

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus spp.*) y el maíz (*Zea mays L.*) son los cultivos más importantes del sector agropecuario en México, pues cubren más de la mitad de la superficie cultivada en el país, para el ciclo 2013 Primavera-Verano Otoño-Invierno (P-V+O-I), en condiciones de riego y lluvia se obtuvo una producción de maíz de 22.6 millones de toneladas, y para frijol fue 1.2 millones de toneladas (SIAP, 2015).

No obstante el consumo per cápita anual de frijol en México ha pasado de 22 a tan solo 11 kg (Reynoso et al., 2007). A pesar de lo anterior, el frijol sigue siendo una fuente importante de proteínas, minerales y vitaminas en la dieta de los mexicanos. Aunque la demanda del frijol ha disminuido aproximadamente 45% en los últimos diez años, debido a los cambios en los hábitos alimenticios de la población, y otros factores que causan incertidumbre en los productores de frijol, como lo es la siembra en zonas de temporal (tiempo de lluvias continuas) y sin acceso a insumos en al menos 75% de la superficie.

Resulta necesario realizar investigación que permita el desarrollo de nuevas variedades de frijol tolerantes a los factores adversos que actualmente inciden en la producción ,y con ello obtener mayor rendimiento, y además demostrar su valor y los beneficios que conlleva el consumo de esta leguminosa.

A pesar de ser un recurso genético de importancia, el frijol ayocote (*P. coccineus L.*) especie nativa del área de México y Guatemala, no ha sido aprovechado totalmente en México (Miranda, 1990a). Estudios previos han demostrado que esta especie cuenta con el potencial para el desarrollo de resistencia genética a enfermedades (Santalla et al., 1998; Mahuku et al., 2003; Singh et al., 2009) y tolerancia a bajas temperaturas (Rodríguez et al., 2006) en *P. vulgaris L.*

Este trabajo tiene por objeto mejorar y actualizar el conocimiento sobre *P. coccineus* , de manera que pueda ser empleado y aprovechado en el desarrollo de nuevas variedades de frijol común y de la especie misma.

En México, el cultivo del frijol (*Phaseolus* spp.) representa para los productores una fuente importante de ingresos y a su vez, una garantía de seguridad alimentaria, además de ser la principal fuente de proteína para la población humana (Zizumbo et al., 2005). El 90% de su producción se destina al mercado interno (SAGARPA, 2012). A lo largo de la historia de México, el frijol ha sido un alimento tradicional, así como un rasgo de identificación cultural. Por lo anterior, conservar los recursos fitogenéticos del género *Phaseolus* es una actividad que debe considerarse como prioritaria (López et al., 2005). También, la diversidad genética de *Phaseolus* spp. es importante para el desarrollo de nuevas variedades utilizadas para la agricultura y la alimentación

En México se han domesticado más de 100 especies importantes en la agricultura, entre ellas el género *Phaseolus* (Delgado, 1985) Se estima que este género en la actualidad cuenta al menos con 77 especies confirmadas (Debouck, 2013. Comunicación personal), la mayoría de ellas silvestres. Se han domesticado cinco especies: *P. vulgaris* L. (frijol común), *P. coccineus* L. (frijol ayocote), *P. lunatus* L. (frijol lima), *P. acutifolius* Gray (frijol tépari), y *P. polyanthus* Greenman (frijol botil). Diversos estudios señalan que el centro de origen de *Phaseolus* se ubica principalmente en el área de México y Centroamérica (Kaplan, 1980; Llaca et al., 1994; Santalla et al., 2004; Delgado et al., 2006) y datos de secuencias nucleotídicas de *P. vulgaris* han revelado que tiene centro de origen Mesoamericano (Bitocchi et al., 2012)

Por otra parte, en el centro de México se ha reducido la superficie cultivada con asociaciones frijol común-frijol ayocote y maíz-frijol, debido, entre otras cosas, a factores económicos y sociales, como cambios de hábitos alimenticios, migración, y recientemente el encarecimiento del grano, lo cual dificulta aún más su consumo (Ramírez et al., 2006).

El conocimiento de los patrones de diversidad genética podrá incrementar la eficiencia de conservación, utilización y mejoramiento genético del género (Beebe et al., 2000). A pesar de la gran probabilidad de que México sea el centro de origen de *P. coccineus* (Llaca et al., 1994), pocos son los estados donde se produce y consume esta leguminosa, y entre los que sobresalen los Estados de México, Puebla, Tlaxcala, Veracruz, Hidalgo,

Querétaro, Michoacán, Oaxaca, Guanajuato, San Luis Potosí y Chiapas (Vargas et al., 2007). Sin embargo, *P. coccineus* se llega a consumir más que el frijol común en países como España, Italia, Holanda y Reino Unido, tanto como vaina verde fresca (ejote) como en forma de semillas secas. En Hungría, República Checa y Eslovaquia se siembra el frijol ayocote asociado con frijol común (Santalla et al., 2004). *P. coccineus* se ha utilizado en México como cultivo de cobertura (Navarro et al., 2007), para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos (Sangabriel et al., 2006), así como en experimentos con ratas (*Rattus* spp.) para el tratamiento contra el cáncer de colon (Reynoso et al., 2007), obteniéndose buenos resultados en la reducción de la incidencia de cáncer en ratas raza Sprague-Dawley alimentadas con frijol ayocote (variedad Blanco Tlaxcala) y frijol común (variedad Pinto Zapata).

ORIGEN, DIVERSIFICACIÓN Y ADAPTACIÓN DE *P. coccineus* L. EN MÉXICO

Las múltiples domesticaciones en el tiempo y/o espacio han determinado la estructura de la diversidad genética de los cultivos (Chacón et al., 2005). La domesticación del frijol ocurrió en Mesoamérica y en el sur de los Andes (Gepts y Bliss, 1985). Las áreas de domesticación del frijol ayocote aún se desconocen (Rodiño et al., 2006). El germoplasma de *P. coccineus* es claramente diferente tanto en la morfología de la planta como en el grano en comparación con *P. vulgaris* (Santalla et al., 2004), aunque este puede recombinarse con *P. coccineus* siempre y cuando *P. vulgaris* sea el progenitor femenino (Al-Yasiri y Coyne, 1965; Miranda, 1990 b; Singh et al., 2009; Angioi et al., 2009).

El mejoramiento del frijol común y frijol ayocote con el paso del tiempo ha propiciado el desarrollo de diversas variedades debido a las cruces realizadas por el hombre, con el fin de obtener un mayor rendimiento del grano, resistencia a enfermedades y adaptación a diversos ambientes (Singh et al., 2009). Los restos arqueológicos indican que el origen de *P. coccineus* va de Durango a Veracruz en México, y se sugiere que la domesticación ocurrió en las zonas húmedas y altas de los estados de Puebla y Durango (Debouck, 1994). La diversificación de *P. coccineus* ha ocurrido en parte debido a su grado de adaptabilidad respecto a las otras cuatro especies

domesticadas de *Phaseolus* spp. *P. coccineus* se distingue por crecer mejor en altitudes superiores a los 1400 msnm, temperaturas templadas y altos niveles de precipitación. El peso de 100 semillas de la forma cultivada de *P. coccineus* tiene un peso que oscila entre los 80 a 170 g, y en la forma silvestre es de 6 a 12 g. Las flores son color escarlata o blancas, y en ocasiones se encuentran ambos colores en una misma flor. La planta florece a los 50 días en variedades tempranas; en la mayoría de los casos presenta polinización cruzada (12,6-14,7%) y las semillas de las variedades silvestres se dispersan por dehiscencia natural (Muruaga et al., 1992; Mercati et al., 2013).

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *P. coccineus*

En México, alrededor de 90% de los frijoles silvestres y criollos no están conservados en bancos de germoplasma (Paredes, 2001). El crecimiento desordenado y agresivo de las áreas urbanas del país, la erosión del suelo, el uso excesivo de herbicidas, y los cambios climáticos dan un panorama de alto riesgo sobre los recursos genéticos de *Phaseolus*. Dentro de este contexto se ha encontrado que algunas especies originarias de México, tales como *P. chiapasanus* y *P. xolocotzii*, hace años que no se detectan en el país (FAO, 1995).

En la actualidad se trabaja con ADN de cloroplasto (ADNcp) para reconstruir la filogenia en plantas mediante análisis de especies a nivel intra-específico (Chacón et al., 2007) y así establecer los grados de parentesco entre especies del complejo *Phaseolus*, así como en estudios evolutivos que sugieren un solo centro de domesticación de *P. coccineus*, ubicado en el estado de Puebla (Llaca et al., 1994).

El análisis de 31 accesiones de *Phaseolus* (27 de *P. coccineus* que incluían a *P. coccineus* subsp. *Darwinianus*, y *P. coccineus* subsp. *glabellus*; tres de *P. vulgaris* y una de *P. lunatus*) con base en los patrones de restricción del ADNcp diferenció claramente al germoplasma entre especies de *Phaseolus*. Además, *P. coccineus* presentó niveles de polimorfismo molecular intra-específico mayores tanto en las accesiones silvestres como en las cultivadas, en comparación con el germoplasma de las otras especies estudiadas (Fig. 1).

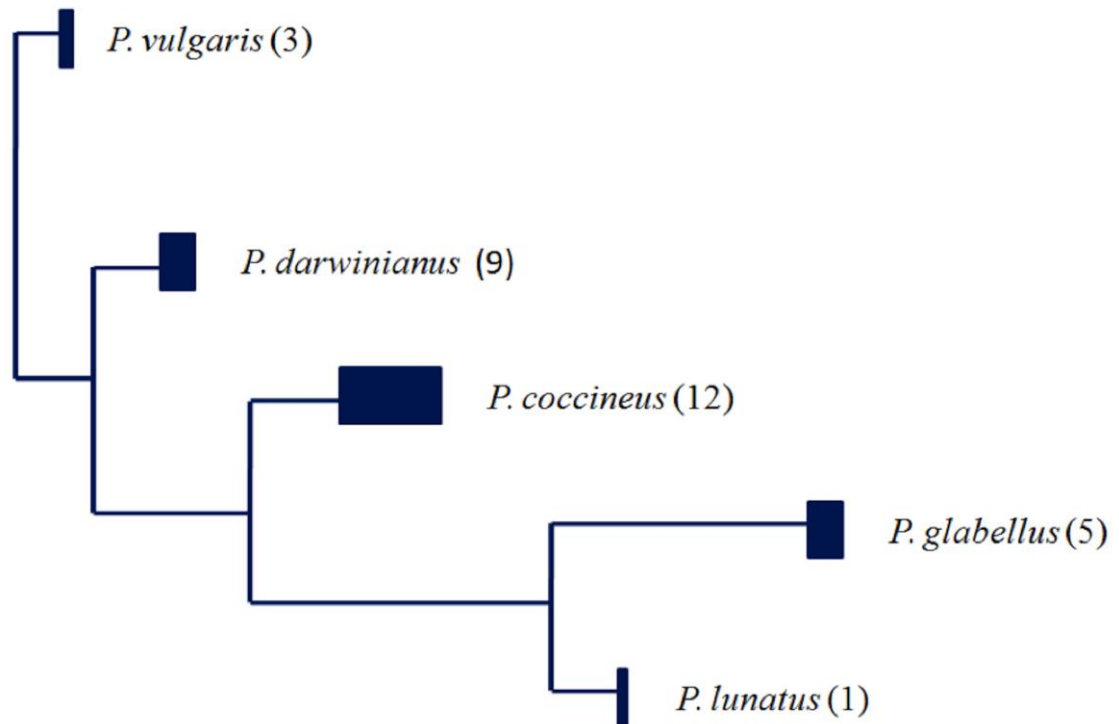


Fig. 1. Análisis molecular de 31 accesiones de *Phaseolus* (Adaptado de Llaca et al., 1994).
Fig. 1. Molecular analysis of 31 accessions of *Phaseolus* (Adapted from Llaca et al., 1994).

En Italia se analizaron 66 genotipos que representaban 14 variedades locales de *P. vulgaris* y nueve variedades de *P. coccineus* colectadas en Marche, Italia. La diversidad y las relaciones genéticas en germoplasma de *P. coccineus* se evaluaron mediante marcadores del tipo intersecuencias simples repetidas (ISSRs), secuencias simples repetidas (SSRs) y secuencias simples repetidas de cloroplasto (CpSSRs). Los resultados indicaron que la selección por los agricultores y la adaptación a ambientes heterogéneos es lo que ha permitido que estas razas de frijol común actualmente se mantengan en los cultivos. Se detectaron nueve marcadores polimórficos para *P. coccineus* y ocho para *P. vulgaris*, el índice de diferenciación genética conocido como valor de F_{st} (el cual se define como la reducción en heterocigosidad esperada bajo apareamiento aleatorio en un nivel jerárquico en relación con otro nivel superior, atribuible a la diferenciación de poblaciones en los grupos genéticos, y sus valores oscilan entre 0 y 1) indicó valores altos para ambas especies (0.85 para *P. vulgaris* y 0.72 para *P. coccineus*). En cuanto al origen, 71% de las variedades locales de *P.*

vulgaris en Marche, Italia, tienen origen Andino, lo que contribuye a la definición de estrategias para la conservación de los recursos genéticos de *Phaseolus* presentes en esas regiones, por ejemplo realizar cruzas con nuevo germoplasma de origen andino para lograr materiales mejor adaptados a las nuevas condiciones ambientales imperantes, y así asegurar la preservación del recurso genético (Sicard et al., 2005).

Ramírez et al. (2006) caracterizaron morfológicamente en Tecamac, México, 107 poblaciones de frijol común, 42 de frijol ayocote y una de frijol acalete (*P. coccineus* ssp. *darwinianus*) con base en once variables cualitativas y 16 cuantitativas. La variación entre poblaciones de frijol común fue mayor que entre las poblaciones de ayocote para color de flor, color de semilla y forma predominante del ápice de la vaina. Las poblaciones de frijol ayocote fueron más diversas en cuanto al color de la semilla (54.8% morado, 26.2% negro y 19.0% blanco y café) y formaron dos grupos de accesiones definidos con base en la precocidad, el número de semillas por vaina y el tamaño de la semilla. La diversidad del frijol común fue mayor respecto a la del frijol ayocote, y probablemente se debe al intercambio de semillas en los mercados regionales y su empleo en los sistemas de cultivo de asociación maíz-frijol.

Ruíz (2009) evaluó la diversidad genética de 149 accesiones de frijol ayocote (*P. coccineus*) de la Subprovincia Carso Huasteco de Puebla, México, mediante marcadores moleculares AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) con cuatro combinaciones de oligonucleótidos obtuvo un valor de $F_{st} = 0.93$, lo cual indica alta diferenciación genética entre accesiones. También encontró mayor proporción de varianza molecular dentro de accesiones (79.02%) más que entre accesiones (21.98 %) y sugiere que ello puede deberse a la alogamia de la especie (14.7%). Además empleó diez secuencias genómicas SCARS (Sequence Characterized Amplified Regions) para detectar resistencia a tizón común (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith.) y antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum* Sac & Magn., teleomorfo *Glomerella lindemuthiana* Shear.) de los cuales solo siete amplificaron productos de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Las accesiones de Zacapoaxtla y Tlatauquitepec, Puebla, tuvieron la mayor amplificación de secuencias SCAR con 12.3 y 5.1, respectivamente.

Por lo anterior recomienda que dichas accesiones de ayocote sean incorporadas en futuros programas de mejoramiento de *Phaseolus* spp.

Angioi et al. (2010) estudiaron la dispersión de 307 genotipos europeos de *P. vulgaris* y 94 genotipos de América representativos del acervo andino y mesoamericano con seis marcadores microsatélites de cloroplasto más dos de origen nuclear. Sus resultados indican que las rutas de expansión del frijol en Europa son complejas, debido a las diversas introducciones de materiales del nuevo mundo, y que a su vez fueron mezclados con intercambios directos entre países Europeos y Mediterráneos; otro resultado indicó que el 44% del germoplasma europeo es derivado de la hibridación de materiales Andinos y Mesoamericanos y se encuentra distribuido en toda Europa, aunque de manera desigual, pues presenta altas frecuencias (86%) en Europa Central (Austria, Francia, Holanda, Alemania, Inglaterra y Suecia), y bajas frecuencias (64%) en España e Italia. En base a estos datos ellos sugieren que el continente europeo sea considerado como un centro secundario de diversificación de *P. vulgaris*

En Italia, Spataro et al. (2011) estudiaron la diversidad genética de *P. coccineus* procedente de doce países europeos (Austria, Turquía, Alemania, Hungría, Italia, Polonia, Portugal, Rumania, República Eslovaca, Eslovenia, España y Holanda) y contrastaron con materiales tanto silvestres como cultivados de México, Honduras, Guatemala y Costa Rica. La colección incluyó 128 formas cultivadas de Europa, más 28 formas silvestres y 52 cultivadas ambas de Mesoamérica. Las accesiones fueron estudiadas mediante doce marcadores microsatélites; como resultado obtuvieron que los acervos genéticos Mesoamericano y Andino fueron claramente diferenciados con base en sus patrones alélicos, lo cual indica una reducción de la riqueza alélica para las poblaciones europeas (3.9 alelos) respecto de las mesoamericanas (6.2 alelos) por lo que este estudio proporciona una imagen de la distribución de la diversidad genética del ayocote y los resultados ocasionados con la introducción en el Viejo Mundo, misma que anteriormente no estaba disponible. También subrayan que la diversidad genética de materiales silvestres y cultivados son fuente importante para *Phaseolus* spp. por lo que merecen ser conservados *in situ* y *ex situ*.

También Ávila et al. (2012) analizaron la diversidad genética de 174 accesiones de frijol común (*P. vulgaris*) y como testigos emplearon ocho accesiones de *P. augusti* Harms, dos de *P. lunatus* y una de *P. coccineus* del Sur de los Andes (Bolivia); para ello usaron veintinueve marcadores microsatélites. Los resultados indican altos niveles de polimorfismo ya que el análisis arrojó un total de 311 alelos identificados y un promedio de 10.7 alelos por marcador. Mediante análisis de correspondencia fue posible diferenciar a *P. vulgaris* de las otras especies de *Phaseolus*. Las accesiones de frijol común se separaron en dos grupos: el primero incluyó accesiones de origen Andino, principalmente de elevada altitud, y el segundo estuvo conformado por materiales de origen Mesoamericano y de altitudes bajas. Las accesiones silvestres resultaron muy diversas y fueron diferentes de las escapadas (material de la forma silvestre que crece cerca de parcelas con material domesticado) y cultivadas. Distancias geográficas pequeñas (menos de 100 km) mostraron distancias genéticas cortas. Estos resultados son importantes para la conservación del frijol común del Sur de los Andes.

RECURSOS GENÉTICOS DE *P. coccineus* L. : APLICACIONES

El uso de germoplasma silvestre es necesario para transferir genes deseables a las formas cultivadas de *Phaseolus*, puesto que las especies silvestres tienen características favorables para la adaptación a diversas condiciones ambientales (Acosta et al., 1996). Mediante el uso de la selección asistida por marcadores moleculares se ha logrado transferir genes con características favorables a nivel de especie en el género *Phaseolus* (Yu et al., 2000). Diversos estudios han encontrado suficiente variación genética en la mayoría de las características de calidad determinadas en *Phaseolus* (tamaño de la semilla, grosor de la testa, cantidad de proteína) por lo que existe la posibilidad de su mejoramiento a través de la recombinación y selección (Pérez et al., 2002). El germoplasma de variedades nativas también es fuente de variabilidad genética que se ha utilizado en el mejoramiento genético del frijol. Existen bajo conservación *ex situ* extensas colecciones de cada una de las cinco especies domesticadas. El manejo de las colecciones grandes de germoplasma para mejoramiento genético es difícil por los altos costos que implica. La colección nacional de germoplasma de frijol ayocote del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de México la conforman

798 accesiones, que cuentan con información geográfica de los 798 sitios de colecta (Vargas et al., 2012). (Cuadro 1). La variabilidad genética y fenotípica de las plantas está influenciada por factores climáticos donde crece y se presume evolucionó la especie; el rango de precipitación de los 140 sitios de colecta de las 798 variedades nativas es de 500 a 1000 mm de precipitación anual. El rango de temperatura mínima y máxima media anual separó los sitios en: muy fríos (de -5 a 1°C en la noche y 21 a 31°C en el día); fríos (de 3 a 5°C y 25 a 33°C); y semifríos (de 6 a 9°C y 25 a 37°C). Dada la amplitud de dichos rangos de precipitación y temperatura que ocurre en un año se infiere la posible existencia de plasticidad fenológica en las plantas de esta colección (Vargas et al., 2013). Por ejemplo, los ayocotes de la subprovincia fisiográfica Carso Huasteco de México, se diferenciaron en dos grupos: de ciclo biológico tardío >110 días y semillas grandes desarrollados por selección empírica de campesinos locales en sitios con temperatura mínima de 2 a 5°C; y los de ciclo precoz <110 días y semilla chica cultivadas en sitios con temperatura mínima de 0 a -2°C (Vargas et al., 2011).

Cuadro 1. Distribución geográfica y características edafoclimáticas de sitios originales de colecta de variedades nativas de *P. coccineus* L. resguardadas *ex situ* en INIFAP, México.

Table 1. Geographical distribution and edaphoclimatic characteristics of *P. coccineus* L native varieties collection sites of under *ex situ* conservation in INIFAP, Mexico.

Variable	Descriptor
Entidad federativa*	Puebla, Estado de México, Tlaxcala, Veracruz, Querétaro, Hidalgo, Michoacán, Oaxaca, San Luis Potosí, Guanajuato y Chiapas.
Rango altitudinal	El 50.3 % (401 accesiones) corresponden a altitudes entre 2000 y 2600 msnm; 39.1 (302) de 1400 a 2000; 6.1 (49) de 800 a 1400; 4.4 (35) alturas superiores a 2600. Sólo una accesión fue colectada a una altura inferior a los 800 msnm.
Región natural	El 72.3 % del germoplasma pertenece a zonas templadas, el 11.4 a zonas áridas, 8.4 al trópico subhúmedo, y el 7.9 pertenecen al trópico húmedo.
Provincia y subprovincia fisiográfica	En México hay seis provincias fisiográficas y 18 subprovincias. Las más representadas con el Eje Neovolcánico (53%); Sierra Madre Oriental (28); Sierra del Sur (13); Mesa del Centro (5); Sierra de Chiapas, Guatemala y la Cordillera Centroamericana (1). Las Subprovincias más representadas son el Eje Neovolcánico (Lagos y volcanes del Anáhuac, y Llanuras y Sierras de Querétaro e Hidalgo); Sierra Madre Oriental (Carso Huasteco); Sierra Madre del Sur (Sierras Orientales y Mil Cumbres); Mesa del Centro (Sierras y Llanuras del Norte de Guanajuato) y Sierra de Chiapas y Guatemala (Sierras del Norte de Chiapas).
Tipo de suelo	El tipo de suelo predominante para los sitios de colecta es el Cambisol Éútrico (45%), Feozem Háptico (18), Andosol Mólico (10), Andosol Úmbrico (6) y Leptosoles (15) el 6% restante provienen de sitios con suelos Regosol, Vertisol, Alisol, Calcisol, Arenosol, Acrisol y Nitisol.
Tipo de clima	El 62% de las accesiones colectadas pertenece a sitios con clima templado húmedo y/o subhúmedo, 18% a climas cálidos y semicálidos, 15% a climas áridos y semiáridos, y solo 5% a climas semifríos.
Tipo de vegetación	El 74% proviene de sitios boscosos, el 11% de la sabana arbustiva, 10% a vegetación semidesértica, y 5% provienen de la alta montaña

* = El 50% de las accesiones son del Estado de Puebla y en los demás estados el porcentaje varía entre 0.9% y 13.4%.

TRABAJOS CON *P. coccineus* L.

El estudio y manejo de la diversidad genética de frijol común es limitado. La introgresión de *P. coccineus* x *P. vulgaris* ha sido exitosa para la obtención de plantas resistentes a enfermedades bacterianas (*Xanthomonas* sp.) (Santalla et al., 2004); *Rhizoctonia solani* (Beaver et al., 2007); *Fusarium* sp. y *Sclerotinia sclerotiorum* (Santalla et al., 2004; Singh et al., 2009; Singh et al., 2014; Viteri y Singh, 2014).

Las bajas temperaturas retrasan la germinación y la emergencia de las plantas de *P. vulgaris* mientras que *P. coccineus* es una especie que soporta temperaturas moderadamente bajas para su germinación. Rodiño et al., 2006 ha identificado ayocotes tolerantes a bajas temperaturas (14/8°C día/noche) durante el proceso de germinación; accesiones PI325592, PI510637, PI313313, PI325608, PI535276. Por otra parte, se han realizado estudios de fitoremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, donde se ha demostrado que *P. coccineus* tolera y crece en estas condiciones, debido a una mayor población rizosférica de bacterias y hongos en contraste con otras cinco especies empleadas en este estudio *Cicer arietinum*, *Clitoria ternatea*, *Panicum maximum*, *Brachiaria brizantha* y *Brachiaria* híbrido (Sangabriel et al., 2006).

Estudios realizados en ratas (*Rattus* sp.) han demostrado que el consumo de frijol en cantidades apropiadas reduce el cáncer de colon. El cáncer fue inducido mediante la inyección de 1,2 dimetilhidrazina (DMH). Luego, las ratas se alimentaron con granos de gran demanda en México: tres variedades de *P. vulgaris* (Flor de Junio Marcela, Pinto Zapata, Flor de Mayo Anita) y una de *P. coccineus* (Blanco Tlaxcala). A las ratas se les dieron cantidades similares al promedio de consumo actual (0.30g 100 g⁻¹ de alimento, que equivale a 11 kg persona⁻¹ al año). Las alimentadas con frijol Blanco Tlaxcala (*P. coccineus* L.) (0.30g 100 g⁻¹ de alimento) y Flor de Junio Marcela (75g 100 g⁻¹), disminuyeron entre 10 y 12% la carcinogénesis del colon. El consumo de la variedad de frijol Pinto Zapata redujo 36% la incidencia de tumores (Reynoso et al., 2007).

También se han detectado genes que confieren resistencia al virus del mosaico dorado amarillo del frijol (BGYMV por sus siglas en inglés) en la accesión G35172 de

P. coccineus del CIAT de Colombia y estos se han introgresado al frijol común. El gen recesivo *bgm-3* confiere resistencia a la clorosis foliar y el dominante *Bgp-2* previene la deformación de la vaina, por lo que los dos genes de *P. coccineus* pueden contribuir a una mayor resistencia al BGYMV en frijol común (Osorno et al., 2007).

Un estudio con *P. coccineus* ha revelado que la especie posee niveles de resistencia elevados a *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) patógeno causante de la enfermedad conocida como mancha angular y que es un serio problema en el rendimiento de frijol, ya que es agente causante de severas pérdidas de grano (Busogoro et al., 1999)

Por otra parte, se ha comparado la aptitud para cobertura vegetal del suelo con cinco especies vegetales (*P. coccineus*; dos variedades de *Vicia faba*, *V. sativa* y *Avena sativa*) así como la producción de grano de todos ellos. Los mayores rendimientos de grano los mostraron *P. coccineus* y *V. sativa* con 2.96 t ha⁻¹ y 1.06 t ha⁻¹, respectivamente y, en cuanto a cobertura, *V. sativa* y *A. sativa* presentaron los mayores porcentajes a los 30, 61, 86 y 126 días después de la siembra (Navarro et al., 2007).

P. coccineus presenta tolerancia a la salinidad durante su desarrollo. Por ello, se evaluaron 132 accesiones de 14 especies silvestres (*P. acutifolius* Gray, *P. angustissimus* A. Gray, *P. carteri* Freytag & Debouck, *P. filiformis* Benth, *P. glabellus* Piper, *P. leptostachyus* Benth, *P. lunatus* L., *P. micranthus* Hook & Arnold, *P. microcarpus* Mart., *P. mcvaughii* A. Delgado, *P. oligospermus* Piper, y *P. vulgaris* L.) y once accesiones que representan cinco especies cultivadas (*P. acutifolius*, *P. coccineus*, *P. lunatus*, *P. polyanthus*, y *P. vulgaris*) en una solución que contenía 0 y 180 mM de NaCl por 21 días. Las accesiones silvestres de *P. acutifolius*, *P. filiformis*, *P. lunatus*, y *P. vulgaris* mostraron amplio rango de variación en su tolerancia a salinidad (180 mM) con base en los valores de biomasa entre tratamientos; en cambio se observó menor tolerancia a la salinidad (100 mM) en accesiones silvestres de *P. micranthus*, *P. filiformis*, *P. mcvaughii*, *P. lunatus*, *P. vulgaris* y en las cultivadas de *P. coccineus*; las accesiones silvestres de *P. filiformis* Benth, fueron más tolerantes (9 de 11 accesiones).

En cambio, la accesión silvestre de *P. vulgaris* fue más tolerante a salinidad que tres cultivadas de la misma especie (Bayuelo-Jiménez et al., 2002).

Por último, cabe mencionar que el cruzamiento interespecífico de *P. vulgaris* con *P. coccineus* es posible siempre y cuando *P. vulgaris* sea el progenitor femenino (Miranda, 1990 b; Angioi et al., 2009) además de ser una especie evolutivamente estable por largos periodos de tiempo mediante autopolinización o a través de entrecruzamientos con otras especies afines (González et al., 2014) En la Fig. 2 se observa la semejanza morfológica entre *P. coccineus* (grupo 1) y el híbrido natural. Se considera que el híbrido proviene del cruzamiento natural entre *P. vulgaris* y *P. coccineus* (grupo 2). Por todo lo anterior, es necesario enfatizar la importancia que *P. coccineus* representa como especie viable para producción de grano y potencial contribución en programas de mejoramiento genético del frijol común.

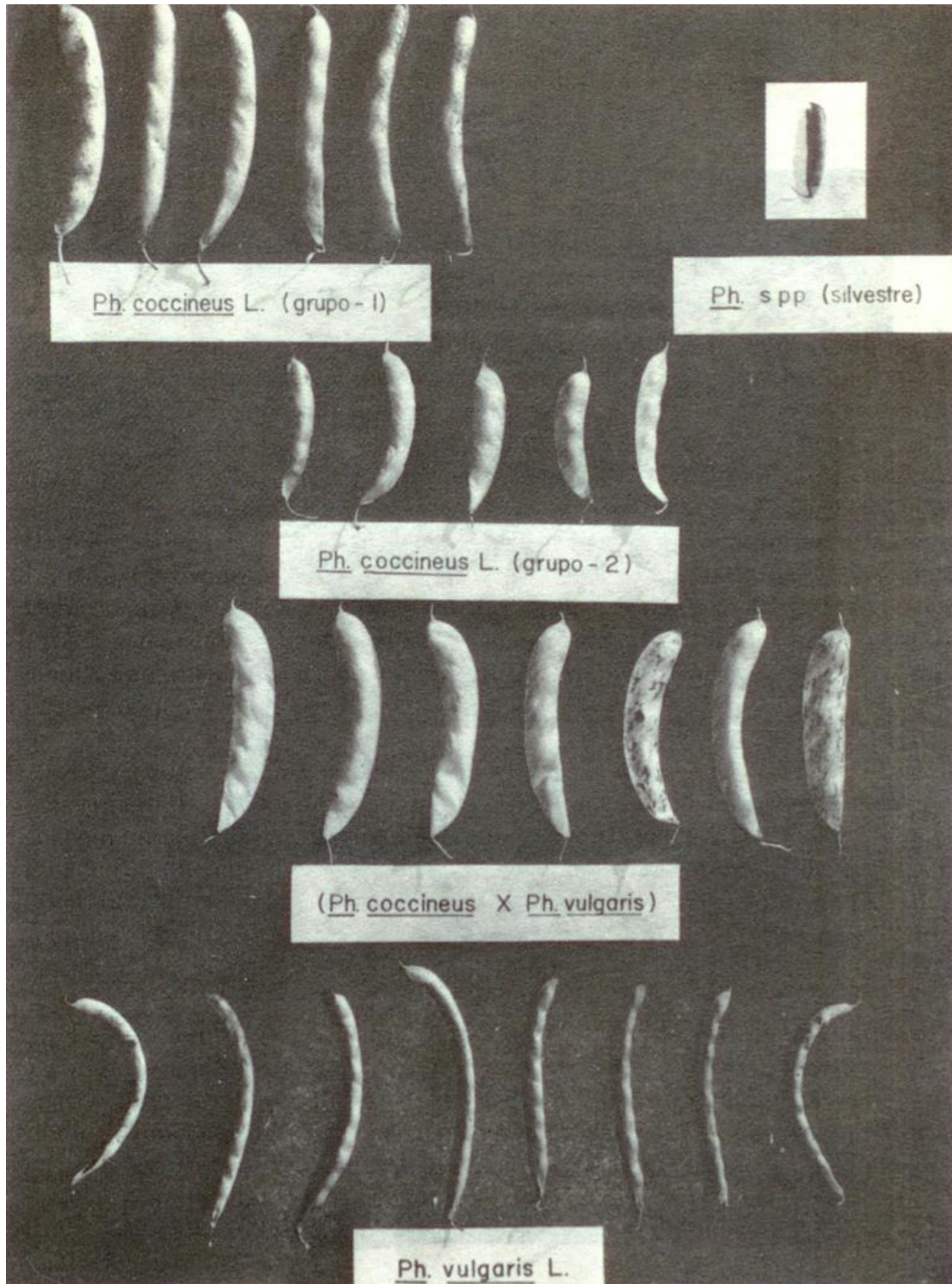


Fig. 2. Características de la vaina de ayocote, *P. vulgaris* x *P. coccineus* (híbrido natural) y *P. vulgaris*. Los grupos 1 y 2 de *Phaseolus coccineus* son poblaciones que difieren desde el punto de vista morfológico. (Miranda, 1990b).

Figure. 2 Features of Pod of runner bean, *P. vulgaris* x *P. coccineus* (natural hybrid) and *P. vulgaris*. Groups 1 and 2 of *Phaseolus coccineus* are populations that differ from a morphological point of view. (Miranda, 1990b).

DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

A la fecha el análisis de *P. coccineus* en México es reducido, ya que pocos trabajos tanto genéticos como morfológicos se han realizado con esta especie (Fig. 3) entre los que

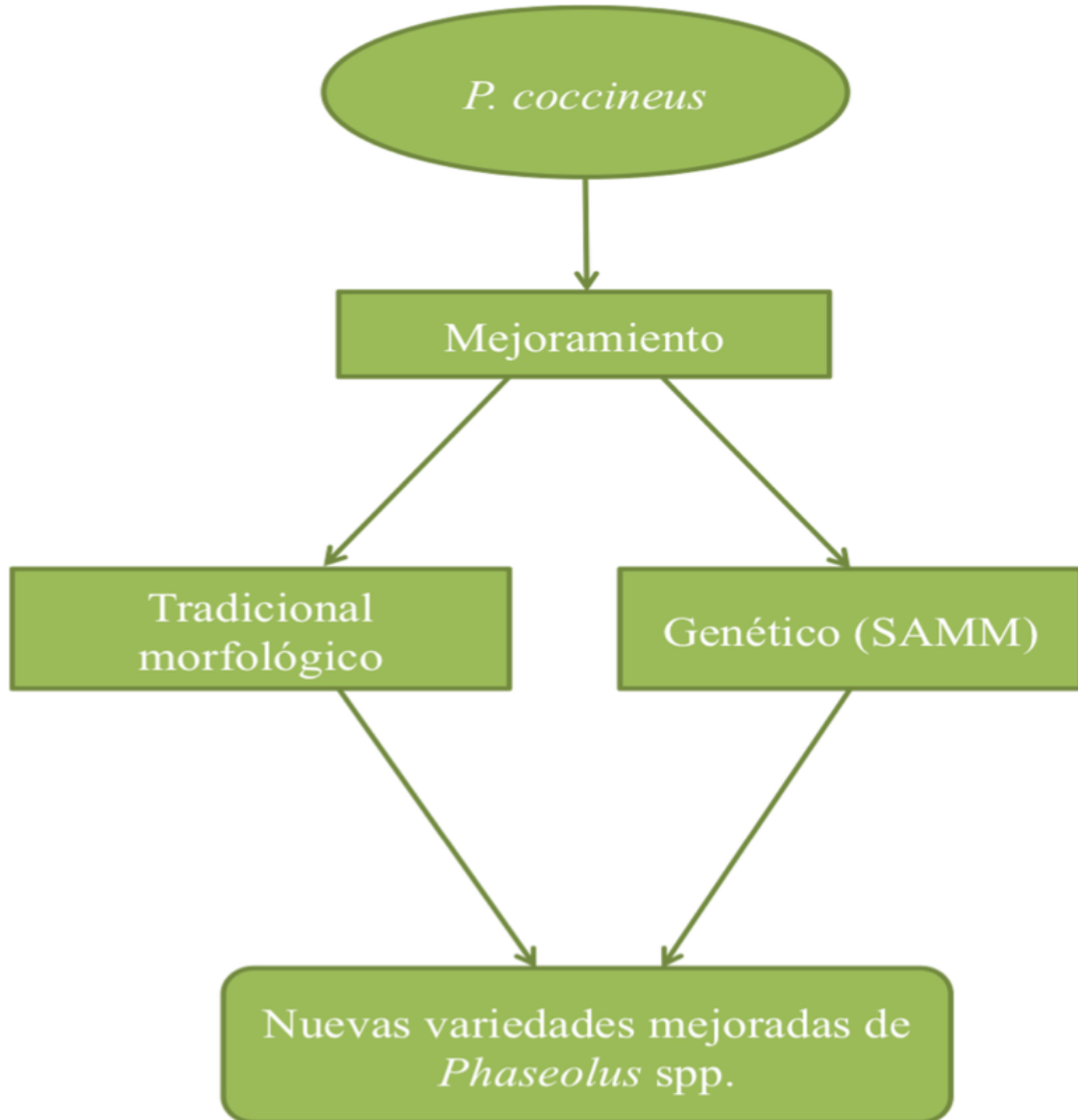


Figura 3. Esquema clásico en el mejoramiento de *Phaseolus coccineus*; SAMM= Selección Asistida por Marcadores Moleculares.

Figure 3. Classic scheme in the improvement of *Phaseolus coccineus*; SAMM= MAS= Marker Assisted Selection.

destacan estudios de la variación morfológica entre y dentro de las especies de *P. vulgaris* y *P. coccineus* del Centro de México; en Europa, *P. coccineus* se ha utilizado

como fuente de resistencia a enfermedades, frío, salinidad y otros factores adversos. Además, se ha utilizado como cultivo de cobertura y remediación de suelos; en estudios para el tratamiento contra el cáncer de colon y en pruebas de tolerancia a la salinidad como especie cultivada. En estos trabajos han quedado demostradas las cualidades de esta especie en cuanto a los beneficios que aporta al hombre y al ambiente, por lo que es necesario profundizar en su investigación y así obtener mayor rendimiento de grano y resistencia a los principales patógenos que afectan al cultivo de frijol en México, como lo son la antracnosis y el tizón común. Es necesario destinar mayor atención y recursos a esta especie para obtener resultados que ayuden a mitigar la carencia de este grano en México.

Los trabajos a desarrollar pueden ser tanto morfológicos como moleculares para contribuir al conocimiento de la estructura de la diversidad genética. Es interesante también, identificar accesiones valiosas que pueden ser seleccionadas para aprovechar las características de interés para el mejoramiento genético, por ejemplo introgresión de genes de resistencia a enfermedades, a otras especies de *Phaseolus* de interés comercial.

Por último es necesario el desarrollo de nuevas técnicas para el manejo, uso y aprovechamiento de esta leguminosa, ya sea para consumo humano o forraje, pues por ser planta perenne es necesario desarrollar estrategias que permitan un manejo integral del cultivo. En cuanto a conservación de materiales es necesario crear bancos de germoplasma, los cuales permiten preservar la semilla a largo plazo y en buenas condiciones para su proliferación

AGRADECIMIENTOS

El autor principal agradece: al Ingeniero José S. Muruaga Martínez por compartir su amplio conocimiento en *P. coccineus*; al Doctor Salvador Miranda Colín (profesor emérito del Colegio de Postgraduados); al CONACyT (beca número 10209) por el apoyo financiero otorgado para llevar a cabo sus estudios de Maestría y Doctorado en Ciencias en el Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional; y al Dr. N. Mayek-Pérez por su apoyo en mi formación profesional.

LITERATURA CITADA

- Acosta, J.A., J.S. Muruaga, F. Cárdenas, y M.M. Khairallah. 1996. Estrategias para la utilización de germoplasma de *Phaseolus* en el mejoramiento genético. *Ciencia* 47:149-160.
- Al-Yasiri, S.A., and D.P. Coyne. 1965. Interspecific hibridization in the genus *Phaseolus*. *Crop Sci* 6:59-60.
- Angioi, S.A., F. Desiderio, D. Rau, E. Bitocchi, G. Attene, and R. Papa. 2009. Development and use of chloroplast microsatellites in *Phaseolus* spp. and other legumes. *Plant Biology* 11:598-612.
- Angioi, S.A., D. Rau, G. Attene, L. Nanni, E. Bellucci, G. Logozzo, et al. 2010. Beans in Europe: origin and structure of the European landraces of *Phaseolus vulgaris* L. *Theor Appl Genet.* 121:829-843.
- Ávila, T., M.W. Blair, X. Reyes, and P. Bertin. 2012. Genetic diversity of bean (*Phaseolus*) landraces and wild relatives from the primary centre of origin of the Southern Andes. *Plant Genet. Res.* 10(1):83-92.
- Bayuelo-Jiménez, J.S., D.G. Debouck, and J.P. Lynch. 2002. Salinity tolerant of *Phaseolus* species during early vegetative growth. *Crop Sci.* 42:2184-2192.
- Beaver, J., M. Alameda, y J.C. Rosas. 2007. Mejoramiento de frijol para resistencia a la mustia hilachosa. p. 60. En Resúmenes de la LIII Reunión Anual del Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de cultivos y Animales, Instituto de Ciencias y Tecnologías Agrícolas. Antigua Guatemala, Guatemala.
- Beebe, S., P.W. Sckroch, J. Tohme, M.C. Duque, F. Pedraza, and J. Nienhuis. 2000. Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop Sci.* 40:264–273.
- Bitocchi, E., L. Nannia, E. Belluccia, M. Rossia, A. Giardinia, P. Spagnoletti, et al. 2012. Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proc. Nat. Acad. Sci* 109(14):788-796.

- Busogoro, J.P., M.H. Jijakli, and P. Lepoivre. 1999. Identification of a novel source of resistance to angular leaf spot disease of common bean within the secondary gene pool. *Plant Breed.* 118:417-423.
- Chacón, I.R., B. Pickersgill, D.G. Debouck, and J.A. Salvador. 2007. Phylogeographic analysis of the chloroplast DNA variation in wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Americas. *Plant. Syst. Evol.* 1:1-21
- Chacón, I.R., S.B. Pickersgill, and D.G. Debouck. 2005. Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. *Theor. Appl. Genet.* 110:432-444.
- Debouck, D.G. 1994. Beans (*Phaseolus* spp). In *Neglected crops: 1492 from a Different Perspective*. p. 47-62. J.E. Hernando B. and J. Leon (eds.). *Plant Production and Protection Series No. 26*. FAO, Rome, Italy.
- Delgado, S.A. 1985. Systematics of the genus *Phaseolus* (Leguminosae) in Mexico and Central America. Ph.D. dissertation. University of Texas. Austin, Texas, USA.
- Delgado, S.A., R. Bibler, and M. Lavin. 2006. Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): A recent diversification in an ancient landscape. *Syst. Bot.* 3:779-791.
- FAO. 1995. Anexo 2 del Informe de la Reunión Subregional sobre los Recursos Fitogenéticos para América Central, México y el Caribe. p. 1-57. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). San José, Costa Rica.
- Gepts, P., and F.A. Bliss. 1985. F₁ hybrid weakness in the common bean. *J. Hered.* 76:447-450.
- González, A.M., A.M. De Ron, M. Lores, and M. Santalla. 2014. Effect of the inbreeding depression in progeny fitness of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.) and its implications for breeding. *Euphytica* 200:413-428.
- Kaplan L. 1980. What is the origin of the common bean? *Econ. Bot.* 19:358-368.

- Llaca, V., A. Delgado, and P. Gepts. 1994. Chloroplast DNA as an evolutionary marker in the *Phaseolus vulgaris* complex. *Theor. Appl. Genet.* 88:646-652.
- López, J.S., J.A. Ruíz, J.J. Sánchez, y R. Lépiz. 2005. Adaptación climática de 25 especies de frijol silvestre (*Phaseolus* spp.) en la República Mexicana. *Rev. Fitotec. Mex.* 28:221-230.
- Mahuku, G.S., C. Jara, C. Cajiao, and S. Beebe. 2003. Sources of resistance to angular leaf spot (*Phaeoisariopsis griseola*) in common bean core collection, wild *Phaseolus vulgaris* and secondary gene pool. *Euphytica* 130:303–313.
- Mercati, F., M. Leone, A. Lupini, A. Sorgonà, M. Bacchi, M.R. Abenavoli, et al. 2013. Genetic diversity and population structure of a common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) collection from Calabria (Italy). *Genet. Resour. Crop Evol.* 60:839-852.
- Miranda, S. 1990a. Identificación de las especies cultivadas del género *Phaseolus*. 20 p. Centro de Genética, Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México..
- Miranda, S. 1990b. Infiltración genética de *Phaseolus vulgaris* en *Phaseolus coccineus*. 58 p. Centro de Genética, Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México.
- Muruaga, M.J.S., F. Cárdenas, y J.A. Acosta Gallegos. 1992. Hibridación natural y métodos de polinización manual en *Phaseolus coccineus* L. p. 307-311. In Memoria de la XXXVIII Reunión Anual Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios y Animales. Managua, Nicaragua.
- Navarro, H., M.A. Pérez, y F. Castillo. 2007. Evaluación de cinco especies vegetales como cultivos de cobertura en valles altos de México. *Rev. Fitotec. Mex* 30:151-157.
- Osorno, J.M., F.H. Ferwerda, M.J. Basset, P.N. Miklas, T. Olczyk, and B. Bussey. 2007. Two genes from *Phaseolus coccineus* confer resistance to Golden Yellow Mosaic Virus in common bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 132(4):530-533.

- Paredes, O. 2001. Pérdida de la riqueza genómica. Disponible en <http://www.jornada.unam.mx/2001/04/30/cien-lopez.html>. (Consulta 25 de febrero de 2015).
- Pérez, P., G. Esquivel, R. Rosales, y J.A Acosta. 2002. Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México. Arch. Lat. Nutr. 52:172-180.
- Ramírez, P., M. Castillo, F. Castillo, y S. Miranda. 2006. Diversidad morfológica de poblaciones nativas de frijol común y frijol ayocote del Oriente del estado de México. Rev. Fitotec. Mex. 29:111-119.
- Reynoso, C.R., M.C. Ríos-Ugalde, I. Torres-Pacheco, J.A. Acosta-Gallegos, A.C. Palomino-Salinas, M. Ramos-Gómez, et al. 2007. El consumo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su efecto sobre el cáncer de colon en ratas Sprague-Dawley. Agric. Téc. Méx. 33(1):43-52.
- Rodiño, A.P., M. Lema, B.M. Pérez, M. Santalla, and A.M. De Ron. 2006 Assessment of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.) germplasm for tolerance to low temperature during early seedling growth. Euphytica 155:63-70.
- Ruíz S., R. 2009. Análisis de la diversidad genética de *Phaseolus coccineus* L. de la Subprovincia Carso Huasteco de México. Tesis Maestro en Ciencias. Centro de Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México.
- SAGARPA. 2012. Consumo de alimentos garantizado. Disponible en <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/nayarit/Boletines/2012/marzo/Documents/B21032012.pdf> (Consulta 25 de febrero de 2015).
- Sangabriel, W., R. Ferrera, D. Trejo, M.R. Mendoza, J.S. Cruz, C. López, et al. 2006. Tolerancia y capacidad de remediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. Rev. Int. Contam. Ambient. 2:263-73.
- Santalla, M., J.B. Power, and M.R. Davey. 1998. Efficient *in vitro* shoot regeneration responses of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. Euphytica 102:195-202.

- Santalla, M., M.C. Menéndez, A.B. Monteagudo, and A.M. De Ron. 2004. Genetic diversity of Argentinean common bean and its evolution during domestication. *Euphytica* 135:75-87.
- SIAP. 2015. Cierre de producción agrícola de maíz y frijol. Disponible en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> (Consulta 26 de febrero de 2015).
- Sicard, D., L. Nanni, O. Porfiri, D. Bulfon, and R. Papa. 2005. Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus* landraces in central Italy. *Plant Breed.* 124:464-472.
- Singh, S.P., H. Terán, S.H. Schwartz, K. Otto, and M. Lema. 2009. Introgressing white mold resistance from *Phaseolus* species of the secondary gene pool into common bean. *Crop Sci.* 49:1629-1637.
- Singh, S.P., H.F. Schwartz, D. Viteri, H. Terán, and K. Otto. 2014. Introgressing white mold resistance from *Phaseolus coccineus* PI 439534 to common Pinto bean. *Crop Sci.* 54:1026-1032.
- Spataro, G., B. Tiranti, P. Arcaleni, E. Bellucci, G. Attene, R. Papa, et al. 2011. Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theor Appl Genet.* 122:1281-1291.
- Vargas, M.L.P., J.S. Muruaga, J.M. Hernández, y J. Díaz. 2007. Los recursos genéticos vegetales en el INIFAP: estado actual perspectivas y desarrollo. Informe de resultados 2007. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias. Texcoco, Estado de México. 67 p.
- Vargas, M.L.P., J.S. Muruaga, R. Lépez, y A. Pérez. 2012. La colección INIFAP de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) I. Distribución geográfica de los sitios de colecta. *Rev. Mex. Cien. Agric.* 3(6):1247-1259.
- Vargas, V.P., J.S. Muruaga, S.E. Martínez, R. Ruíz, S. Hernández, y N. Mayek. 2011. Diversidad morfológica del frijol ayocote del Carso Huasteco de México. *Rev. Mex. Biodiv.* 82:767-775.

- Vargas, .M.L.P., J.S. Muruaga. y A. Pérez. 2013. Temperatura y precipitación de los sitios de colecta de variedades nativas de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.). Rev. Mex. Cienc. Agric. 4(6):843-853.
- Viteri, D., and S.P. Singh. 2014. Inheritance of white mold resistance in an Andean common bean A 195 and its relationship with Andean G 122. Crop Sci. 55:44-49.
- Yu, K., S.J. Park, and V. Poysa. 2000 Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficacy and economics. Plant Breed. 119:411-415.
- Zizumbo, D., P. Colunga, E. Payro, P. Delgado, and P. Gepts. 2005. Population structure and evolutionary dynamics of wild-weedy-domesticated complexes of common bean in a Mesoamerican region. Crop Sci. 45:1073-1083.

7.2. Artículo de Investigación: Ruíz-Salazar, R., M.L.P. Vargas-Vázquez, J.S. Muruaga-Martínez, S. Hernández-Delgado, G. Alexandre-Iturbide, N. Almaraz-Abarca & N. Mayek-Pérez. Analysis of Genetic Variability and Genetic Relationships of Ayocote Beans from México. Artículo de investigación (en proceso de enviar al Journal of Botanical Science)

(en proceso de enviar)

Analysis of Genetic Variability and Genetic Relationships of Ayocote Beans from México

**Régulo Ruíz-Salazar¹, Ma. Luisa Patricia Vargas-Vázquez², José S. Muruaga-
Martínez², Sanjuana Hernández-Delgado¹, Gabriel Alejandro-Iturbide³,
Norma Almaraz-Abarca³ & Netzahualcóyotl Mayek-Pérez^{1*}**

¹ Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional. Blvd. del Maestro
esq. Elías Piña s/n. Col. Narciso Mendoza 88710. Reynosa, México.

² Programa de Recursos Genéticos de Frijol. Campo Experimental Valle de México.
INIFAP. Km. 13.5 Carretera Los Reyes-Texcoco, 56250, Coatlinchán, Texcoco, Estado
de México. México.

³ Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional
(CIIDIR) Unidad Durango- Instituto Politécnico Nacional. Calle Sigma 119
Fraccionamiento 20 de Noviembre II C.P. 34220. Durango, México.

* Corresponding author. Tel/Fax (+52-899) 9243627; e-mail: nmayek@ipn.mx

Abstract

Ayocote beans (*Phaseolus coccineus* L.) is a native legume from Mexico although a little knowledge about its genetic diversity and genetic structure of populations through the environments where it is growing is available. In this work we studied the genetic variability and the genetic relationships among 107 ayocote bean accessions from the state of Veracruz, 30 from Puebla and 15 wild accessions from different geographical regions of Mexico by using 16 microsatellite molecular markers as well as six AFLP primer combinations. As controls we included seven landraces of common bean (*P. vulgaris*) from Veracruz; three breed bean cultivars (BAT 477, Pinto UI- 114, Pinto Villa) and one accession from each *P. lunatus* and *P. glabellus*. AFLP analysis produced more than 500 bands (>80% polymorphic) while 16 SSR loci produced near 500 alleles. SSR were more effective than AFLP to calculate heterozygosity among and within populations, since all SSR alleles were polymorphic while near 15% of AFLP products were monomorphic. Both markers detected the higher portion of molecular variance within accessions rather among populations and defined the genetic structure of populations (seven cluster by SSRs and 8 by AFLPs). Both strategies assigned four groups of coancestry to germplasm from Veracruz; SSRs merged wild *P. coccineus* and controls, while AFLPs separated them and clustered controls with *P. vulgaris* controls. Finally, SSRs did not separate ayocotes from Puebla while AFLPs divided germplasm from Puebla into two well-defined clusters.

Results indicated that ayocote bean domestication could be happened under reproductive isolation conditions and thus, clearly differentiated lineages were produced based on the origin of each population. Since ayocote beans analyzed here include some accessions

with highly genetic variability, they are candidates for conservation and exploitation for *Phaseolus* breeding.

Key words: *Phaseolus coccineus* L., population genetics, genetic variability, genetic relationships, Mexico.

The *Phaseolus* genus are world-wide distributed from temperate to tropical regions and it includes more than 70 species; the species *P. coccineus* (ayocote or runner beans) is the second species in importance behind common bean (*P. vulgaris*) (Freytag and Debouck, 2002). Ayocote beans are originated from México and currently it is developed through temperate-highlands from central and southern México. Ayocote beans are mainly used for human feeding and show high grain yields (more than 2.5 t ha⁻¹) and developing annual or bi-annually (Vargas-Vázquez *et al.*, 2011). Despite ayocote bean consuming are not generalized across Mexico an alternative use as parent in breeding programs of common beans can be performed.

The study of genetic variability based on molecular marker strategies could support the fast and reliable characterizations of ayocote bean genetic structure and genetic relationships among and within accessions as well as the identification of genetic patterns of diversification and levels of genetic diversity based on origins or status (Hernández-Delgado *et al.*, 2015). Genetic diversity of ayocote beans has been previously studied by using morphologic, agronomical and molecular markers. RAPD and AFLP analyses clearly differentiated between *P. vulgaris* and *P. coccineus* accessions from Poland (Nowosielski *et al.*, 2002) while SSR, cpSSR and AFLP analyses suggesting reduced genetic diversity in *P. coccineus* germplasm from Italy (Sicard *et al.*, 2005) and Poland (Boczkowska *et al.*, 2012); in addition *P. coccineus* was

separated based on their gene pools (Sicard *et al.*, 2005; Acampora *et al.*, 2007), with some intermediate genotypes probably produced after hybridization or gene flow among accessions (Acampora *et al.*, 2007). Spataro *et al.* (2011) developed a worldwide *P. coccineus* collection that includes 228 genotypes: 28 wild accessions and 200 landraces (52 from Mesoamérica and 148 from Europe). The clear differentiation among European and Mesoamerican germplasm was found (Rodriguez *et al.*, 2013; Mercati *et al.*, 2015). The introduction of ayocote beans to Europe reduced genetic diversity; wild and landrace germplasm are closely related and showed broad gene flow. A moderate-to-strong cytoplasmic bottleneck that followed the expansion of the species *P. coccineus* and the botanical varieties *albiflorus*, *bicolor* and *coccineus* into Europe was inferred by using chloroplastic and nuclear SSRs and phenotypic analyses as well as multiple domestication events into the species. An adaptive population differentiation was also found suggesting that selection led to diversification of *P. coccineus* in Europe (Rodriguez *et al.*, 2013). Population differentiation provoked population structuring (Catarcione *et al.*, 2013; Mercati *et al.*, 2015) where the most of genetic variation is detected within *P. coccineus* populations due factors as open-pollination among and within populations, seed exchanges and selection that support the hypothesis that Europe could be considered as secondary diversification center for *P. coccineus* (Ruiz-Salazar *et al.*, 2010; Mercati *et al.*, 2015).

In Mexico, efforts have been focused to structure a National *P. coccineus* collection, which includes 798 accessions; most of them ($\approx 80\%$) come from Neo-volcanic Axis and Eastern Sierra Madre, from humid or semi-arid temperate regions and associated to mixed forests of *Quercus* and *Pinus* species. Germplasm was domesticated and then

collected in 140 locations dispersed through 13 Mexican states: 80 % of accessions come from 1500-2000 m above sea level and 500-1000 mm of annual precipitation (Vargas-Vázquez *et al.*, 2012). Ayocote beans from Huasteco Karst (98 accessions) were clearly separated into two groups: one had late accessions adapted to minimum mean temperatures of 2-5 °C with large seeds and large pods and the other included early accessions adapted to minimum mean temperatures of 0 to -2 ° with small seeds and short pods (Vargas-Vazquez *et al.*, 2011; 2013; 2014). Genetic diversity was analyzed in *P. coccineus* from the ‘Huasteco Karst’ located mainly at Puebla, Mexico. Large genetic variability among and within accessions as well as high genetic differentiation among germplasm were found (Ruiz-Salazar *et al.*, 2010).

In this work we analyzed ayocote bean germplasm from Mexico based on 16 SSR markers and six +3/+3 AFLP primer combinations in order to gain information about genetic variability, genetic relationships and genetic structure of populations as well as information that can contribute for conservation and use of *P. coccineus* germplasm for bean breeding.

Materials and Methods

Germplasm

Ayocote germplasm included 164 accessions: 152 of *P. coccineus* (137 cultivated or landraces and 15 wild). As controls we included seven landraces of *P. vulgaris* from the state of Veracruz; three common bean cultivars (Pinto Villa, BAT 477, Pinto UI-114); one accession of *P. glabellus* and other of *P. lunatus*. Seeds of each accession were supplied by the Unidad de Recursos Genéticos of the Instituto Nacional de

Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias sited in Coatlinchán, Texcoco, México. Most of germplasm come from the states of Veracruz and Puebla, representative of the global national collection of *P. coccineus* of Mexico (Fig. 1; Table 1).

DNA isolation

Three seeds per accession were sown under greenhouse conditions at Reynosa, Tamaulipas, México into plastic trays filled with 'peat-moss' and perlite (60:40 w/w). Ten days after plant emergence young and completely expanded leaves were picked-off and maintained under -70 °C. DNA isolation was carried out from 40 mg of leaf tissue which was macerated with liquid nitrogen using a mortar and a pestle. Then, the 'Kit Wizard Genomic Purification' (Promega) was used. Quality and concentrations of DNA isolated were evaluated in agarose gels 1%.

SSR analysis

We included five SSR markers reported for *P. coccineus* (Sicard *et al.*, 2005) as well as 11 reported by Gaitán *et al.* (2002) for *P. vulgaris*. All SSRs show high levels of homology between species (Rajwant *et al.*, 2011) (Table 2). PCR reactions were done in a ABI 9800 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, EUA) using a final volume of 15 µL and including 25 ng of DNA, 0.25 µM of each SSR primer, PCR buffer 1 X, MgCl₂ 3 mM, 300 µM of dNTPs and 1 U of Taq DNA polymerase (Promega). PCR conditions were one cycle of 94° C by 2 min; 36 cycles of 49 – 55° C by 17 s where temperature depending on primers used for each SSR; and one final extension cycle of 72° C by 6 min. Amplified products were separated in acrylamide gels 6.5 % and

revealed by silver staining (Silver Sequence DNA Staining Reagents, Promega). Each gel was read and molecular weights of each amplified band registered using the Molecular Imaging Software V4.0.3 (Kodak; Rochester) in order to construct one molecular weight matrix.

AFLP analysis

A former pre-evaluation of 16 +3/+3 AFLP oligonucleotide combinations were assessed in then only six (Table 3) were used to analyze the complete germplasm, based on polymorphism rates (data not shown). The amplified AFLP fragments were separated by electrophoresis through a 6.5 % polyacrylamide gel (Vos *et al.*, 1995); for this the IRDye™ Fluorescent AFLP® Kit for Large Plant Genome Analysis (LI-COR®, Lincoln, NE) commercial kit was used. To separate the amplified fragments, an IR² semi-automatic sequencing system was made (model 4200-029; *LI-COR*®). The bands were identified visually, generating a binary matrix of the presence (1) or absence (0) of a band produced by each primer set.

Data analysis

SSR data. Each allele by genotype was registered based on its molecular weight. Then, we estimated allele frequencies by SSR. Genetic differentiation scores were estimated using the Analysis of Molecular Variance (AMOVA) and the software GenAlEx V 6.41 (Peakall and Smouse, 2006). Molecular weight data were transformed to one matrix of allele dissimilarities using the equation:

$$d_{ij} = 1 - \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L \frac{m_l}{\pi}$$

where:

d_{ij} : dissimilarity between units i and j

L : number of loci

π : level of ploidy

m_l : number of alleles for l locus

Allele dissimilarity matrix was used to construct a dendrogram based on the ‘Unweighted Neighbor Joining’ method and the software DARWIN V 5.0.158 (Perrier *et al.*, 2003). Genetic structure of populations and coancestry values were determined with STRUCTURE V 2.3.1 (Pritchard *et al.*, 2000) adjusting K value from 1 to 12 and using as criteria 200,000 ‘burning-periods’ and 800,000 replications through-out 20 independent simulations for each K value. Coancestry analysis was carried out assuming an admixture genetic model and correlated in each case. The optimal number of populations was calculated according with ΔK value (Evanno *et al.*, 2005) using the program STRUCTURE HARVESTER V 0.6.92 (Earl y vonHoldt, 2011).

AFLP data. AFLP fragment data were subjected to AMOVA as been described before. In addition the H_T , H_S , D_{ST} and G_{ST} values were also calculated (Nei, 1973; Culley *et al.*, 2002). Genetic distances among populations (Nei, 1972) and Wright F-statistics: F_{IS} (measures of variation of heterozygosity within the varieties with respect to the expected

result based on the allelic frequencies under random mating), F_{ST} (reduction of expected heterozygosity under random mating in a hierarchical level in relation with a superior level, attributable to the variety differentiation in the genetic groups), and the F_{IT} (overall inbreeding coefficient) were measured, too. The estimation of the genetic distances was made using Dice (Nei and Li, 1979) method. First, one genetic distance matrix was elaborated which was used to build a dendrogram with the UPGMA algorithm. The dendrogram was generated with Freetree and Treeview (Page, 1996).

Genetic diversity indexes calculations were performed using GenoDive 2.0b23 (Meirmans and Van Tienderen, 2004). Genetic structure of populations and coancestry values were determined as was previously described by SSR data.

Results

SSR analysis

The SSR analysis indicated that the higher portion of molecular variance is found within accessions while the lowest portion was detected among populations (Table 4). The genetic analysis amplified 481 alleles (30 alleles by SSR locus). Amplified alleles by SSR ranged from 14 to 41 where markers BM147 and BM154 showed the highest number of amplified alleles, although GATS91 y BM147 exhibited the highest values of observed heterozygosity (Table 5).

Cluster analysis by origins and by accessions clearly separated *P. coccineus* from *P. vulgaris*; after, separated wild ayocotes from landraces of *P. coccineus* from the states of Veracruz and Puebla. Finally, the analysis separated most of germplasm from Puebla

and Veracruz (Fig. 1). Genetic structure analysis indicated an optimal $K = 7$ which was closely related to groups formed by to the cluster analysis: four from Veracruz (Veracruz, Jalacingo, Altotonga and the others), Puebla, *P. vulgaris*, *P. coccineus* wilds, controls (Fig. 2).

AFLP analysis

The AFLP analysis produced 529 bands, 86.4% of them polymorphic (Table 3). As SSR analysis, AFLPs detected the highest portion of molecular variance within accessions and the lowest among populations (Table 4). Ayocotes from Veracruz, Jalapa, and Altotonga showed the highest values of AFLP polymorphism as well genetic diversity indexes; the only population from Puebla with similar values come from Tlatlauquitepec (Table 5). Cluster analysis of accessions based on AFLP data separated *P. coccineus* from *P. vulgaris*; after, separated wild ayocotes from landraces of *P. coccineus* from the states of Veracruz and Puebla. Finally, separation of ayocotes from Puebla and Veracruz were not clear as been found in SSR analysis due some accessions were dispersed through the dendrogram (Fig. 1). Genetic structure analysis indicated an optimal $K = 8$ which was closely related to groups formed by the eight groups formed by previous cluster analysis: four from Veracruz (Veracruz, Ciudad Mendoza, Jalacingo + Altotonga, and the others); two from Puebla (Zacapoaxtla + Tlatlauquitepec, and the others); *P. vulgaris* + controls; *P. coccineus* wilds (Fig. 3).

Discussion

In this work the genetic characterization, the genetic relationships and the clustering of diverse species of *Phaseolus* with different geographical origins and /or genetic status

was analyzed by using two marker systems: AFLP (dominant) and SSR (codominant). Both strategies appeared to be efficient and precise to grouping *P. coccineus* accessions and each one showed advantages (Ramakrishnan *et al.*, 2004; Maras *et al.*, 2008; Baraket *et al.*, 2011; Bitocchi *et al.*, 2015). Only six AFLP combinations produced more than 500 bands (>80% polymorphic) while 16 SSR loci produced near 500 alleles. SSR were more effective than AFLP to calculate heterozygosity among and within populations, since all SSR alleles were polymorphic while near 15% of AFLP products were monomorphic. In this case SSRs appeared to be more discriminant than AFLPs due to hypervariability caused by slippage which occurs more frequently than those single nucleotide mutations and/or insertion-deletion events that generate detectable AFLP polymorphisms (Powell *et al.*, 1996; Bitocchi *et al.*, 2015).

The highest marker efficiency of AFLPs compared with SSRs could reside on high 'multiplex-efficiency' of former marker strategy: the larger number of polymorphic bands produced by assay than the allele heterozygosity found by using SSR markers (Baraket *et al.*, 2011; Bitocchi *et al.*, 2015). However, SSR markers as detected high levels of allele diversity estimates lower genetic similarity values compared with AFLPs (Jump and Peñuelas, 2007). We need to take into account the utility of any marker system based on the balance between the polymorphisms detected (information contents) and the magnitude to which an assay can identify multiple polymorphisms (Ignjatovic-Micic *et al.*, 2007).

Despite the specific differences on grouping or topologies in general was evident and consistent at each marker strategy: the clear separation of *P. coccineus* from *P. vulgaris* (Llaca *et al.*, 1994; Nowosielski *et al.*, 2002); wild ayocotes from landraces of *P.*

coccineus from the states of Veracruz and Puebla; finally, discrimination between ayocotes from Puebla and Veracruz. Major differences resided on the number of principal cluster formed by marker strategy, since SSR cluster germplasm into seven clusters while AFLP need eight clusters to clearly grouping *Phaseolus* germplasm. Poor agreement between the two marker systems as well as no grouping based on agro-ecological groups or origins were found in maize (Ignjatovic-Micic *et al.*, 2007) and figs (Baraket *et al.*, 2011). No complete correspondence of clustering or dendrogram or Bayesian coancestry topologies were found among *P. coccineus* and *Phaseolus* species when they were analyzed by SSRs or AFLPs. Maras *et al.* (2008) and Jump and Peñuelas (2007) assumed that each marker strategy target different genomic fractions through the genome of *Phaseolus*. These fractions varies on repetitions or unique sequences which could have showed differential evolution rates through-out the natural of human-selection. Results showed that landraces and wild forms of *Phaseolus*, mainly *P. coccineus*, grown *in situ* represent almost unique populations due their adaptation range which has arisen from their dynamic evolution under a continuous change of agro-ecological environment and the consequent capture of new alleles from hybridization (Spataro *et al.*, 2011; Bitocchi *et al.*, 2015).

This is the first and more extensive work where *P. coccineus* were analyzed based on two highly reliable and informative marker strategies in México, and where representative populations were included. After the performing of a national *P. coccineus* collection including near 800 accessions here we included 137 accessions from Veracruz and Puebla (17% from complete collection) and 23% from the more representative regions which supplied *P. coccineus* germplasm to national collection

(Neo-volcanic Axis and Eastern Sierra Madre regions) (Vargas-Vázquez *et al.*, 2012). Former characterizations of *P. coccineus* germplasm from Mexico emphasized the physiology, phenology, morphology, growth and/or productive behavior (Vargas-Vázquez *et al.*, 2011; 2013; 2014). Only Ruiz-Salazar *et al.* (2010) used AFLP markers to analyze *P. coccineus* from ‘Huasteco Karst’ located mainly at Puebla, Mexico and they reported high genetic variability values among and within accessions as well as high genetic differentiation among germplasm.

This work confirmed the reliability and informative capabilities of two strategies: one dominant (AFLPs) and other co-dominant (SSRs) molecular markers. Both detected the higher portion of molecular variance within accessions rather among populations (Spataro *et al.*, 2011) and basically classified the *P. coccineus* germplasm into well-defined groups of accessions. The genetic structure of populations varied between marker systems. SSR formed seven groups and AFLP formed eight. Both strategies assigned four groups of coancestry to germplasm from Veracruz: Acultzingo, Jalacingo, Altotonga and the others (SSRs) and Veracruz + Ciudad Mendoza, Jalacingo, Altotonga, Acultzingo and the others (AFLPs). The SSRs merged wild *P. coccineus* and controls, while AFLPs separated them and clustered Controls with *P. vulgaris* controls. Finally, SSRs did not separate ayocotes from Puebla while AFLPs divided germplasm from Puebla into two well-defined clusters. Unlike common beans, *P. coccineus* shows significant genetic diversity within populations (Gill-Langarica *et al.*, 2011) indicating that each ayocote accession is constituted by genetically-distinct genotypes. Despite DNA-bulked analysis reduces work and inputs we can sub-estimating the real genetic

nature of each accession, population, etc. Prior conservation strategies must include the optimization of multiplication in order to preserve genetic variability of each one.

Previous analysis of European *P. coccineus* germplasm detected reduced genetic diversity compared with ayocotes from other origins in Italy (Sicard *et al.*, 2005) and Poland (Boczkowska *et al.*, 2012) as well as the clear differentiation of *P. coccineus* based on gene pools (Sicard *et al.*, 2005; Acampora *et al.*, 2007). In our work, SSR analysis clearly defined the seven genetic groups based on coancestry values while AFLP analysis defined an optimum number of clusters = 8. Unlike SSRs, AFLP not 'good-definition' in most of the eight clusters suggesting the presence of intermediate genotypes probably produced after hybridization or gene flow among accessions (Acampora *et al.*, 2007; Spataro *et al.*, 2011).

A worldwide collection of *P. coccineus* was proposed by Spataro *et al.* (2011) which includes 228 genotypes: 28 wild accessions and 200 landraces (52 from Mesoamerica and 148 from Europe). This collection demonstrated the reduction of genetic diversity in ayocote beans after their introduction to Europe from the Americas (Rodriguez *et al.*, 2013; Mercati *et al.*, 2015) due the detection of a moderate-to-strong cytoplasmic bottleneck that followed the expansion of the species *P. coccineus* and the botanical varieties *albiflorus*, *bicolor* and *coccineus* into Europe (Rodriguez *et al.*, 2013).

An adaptive population differentiation was also found suggesting that selection led to diversification of *P. coccineus* in Europe (Rodriguez *et al.*, 2013). Population differentiation provoked population structuring (Catarcione *et al.*, 2013; Mercati *et al.*, 2015) where the most of genetic variation is detected within *P. coccineus* populations

due factors as open-pollination ($\approx 14\%$; Muruaga et al., 1992) among and within populations, seed exchanges and empirical selection (Ramírez-Vallejo et al., 2006; Vargas-Vazquez *et al.*, 2011; 2012; 2013; 2014) that support the hypothesis that Europe could be considered as secondary diversification center for *P. coccineus* (Ruiz-Salazar et al., 2010; Mercati *et al.*, 2015).

Conclusions

Results showed the high genetic differentiation among and within ayocote beans from Veracruz and other sites of Mexico. We can also consider that ayocote bean germplasm can constitute a major gene source to be included in *Phaseolus* breeding programs.

Finally, we suggest that the *in situ* and *ex situ* maintaining, characterization and proper use of *P. coccineus* germplasm are the major challenges for botanist and taxonomist as well as government institutions of Mexico.

Acknowledgments

The first author is grateful to CONACyT and Instituto Politecnico Nacional for scholarships no. 229696/210061 and PIFI-20113577. This work was supported by FOMIX-Gobierno del Estado de Veracruz (grant 98070), CONACYT-Ciencia Básica (grant 181756) and Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN. SHD, GAI, NAA and NMP are scholars of COFAA and EDI-IPN; SHD, NAA and NMP are scholars of S.N.I.-CONACYT. Authors declare that no interest conflict exists.

References

- Acampora A., Ciaffi M., de Pace C., Paolacci A. R., Tanzarella O. A. 2007. Pattern of variation for seed size traits and molecular markers in Italian germplasm of *Phaseolus coccineus* L. *Euphytica* 157, 69-82.
- Acosta J. A., Muruaga J. S., Cárdenas F. y Khairallah M. 1996 Estrategias para la utilización de germoplasma de *Phaseolus* en el mejoramiento genético. *Ciencia* 47, 149-160.
- Ayala O. J., Pichardo J. M., Estrada J. A., Carrillo J. A. y Hernández A. 2006 Rendimiento y calidad de semilla del frijol ayocote en el Valle de México. *Agric. Téc. Méx.* 32, 313-321.
- Baraket G., Chatti K., Saddoud O., Ben Abdelkarim A., Mars M., Trifi M., Salhi Hannachi A. 2011. Comparative assessment of SSR and AFLP markers for the evaluation of genetic diversity and conservation of fig, *Ficus carica* L., genetic resources in Tunisia. *Plant Mol. Biol. Rep.* 29, 171-184.
- Bitocchi E., Bellucci E., Rau D., Albertini E., Rodriguez M., Veronesi F., Attene G., Nanni L. 2015. European Flint landraces grown in situ reveal adaptive introgression from modern maize. *PLOS One* 10, e0121381.
- Blair M. W., González L. F., Kimani P. N. and Butare L. 2010 Genetic diversity, inter-gene pool introgression and nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from Central Africa. *Theor. Appl. Genet.* 121, 237-248.
- Boczkowska M., Bulinska-Radomska Z., Nowosielski J. 2012. AFLP analysis of the genetic diversity in five accessions of Polish runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). *Genet. Resour. Crop Evol.* 59, 473-478.

- Catarcione G., paolacci A. R., Tanzarella O. A., Mercati F., Sunseri F., Capano S., Margaritelli L., Foppoli A., Ciaffi M. 2013. Genetic diversity and population structure of “Fagiolone” (*Phaseolus coccineus* L.) , a landrace cultivated in the regional natural park of Simbruini mountains. In: Proc. 57th Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress. September 16-19, 2013, Foggia, Italy.
- Earl D. A. and vonHoldt B. M. 2011 STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Cons. Genet. Resour. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.
- Evanno G., Regnaut S. and Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol. Ecol. 14, 2611-2620.
- Freytag G. F. and Debouck D. G. 2002 Taxonomy, distribution and ecology of de genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionoideae) in North America, México and Central América. SIDA, Bot. Misc. 23, 1-300.
- Gaitán E., Duque M. C., Edwards K. J. and Tohme J. 2002 Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. Crop Sci. 42, 2128–2136.
- González R. I., Toro O., Duque M. C., Araya R. and Debouck D. G. 2006 Gene flow events among bean species of section *Phaseoli* in Colombia and Costa Rica using microsatellites markers. PCCMCA, LII Reunión Anual. Managua, Nicaragua pp, 1.
- Hernández-Delgado S., Muruaga-Martínez J. S., Vargas-Vázquez M. L. P., Martínez-Mondragón J., Chávez-Servia J. L., Gill-Langarica H. R., Mayek-Pérez N. 2015. Advances in genetic diversity analysis of *Phaseolus* in Mexico. In: Caliskan M.,

- Cevahir G., Öz G. C., Kavakli I. H., Özcan B. 2015. Molecular Approaches to Genetic Diversity. InTech. Rijeka, Croatia. pp, 47-73.
- IBPGR (International Board for Plant Genetic Resources). 1983 *Phaseolus coccineus* descriptors. Rome, Italy pp 1-32.
- Ignjatovic-Micic D., Mladenovic-Drinic S., Nikolic A., Lazic-Jancic V. 2007. Comparison of AFLP and SSR markers for genetic diversity studies in maize populations. *Maydica* 52, 399-406.
- Jump A. S., Peñuelas J. 2007. Extensive spatial genetic structure revealed by AFLP but not SSR molecular markers in the wind-pollinated tree, *Fagus sylvatica*. *Mol. Ecol.* 16, 925-936.
- Llaca V., Salinas A. D. and Gepts P. 1994 Chloroplast DNA as an evolutionary marker in the *Phaseolus vulgaris* complex. *Theor. Appl. Genet.* 88, 646-652.
- Maras M., Sustar-Vozlic J., Javornik B., Meglic V. 2008. The efficiency of AFLP and SSR markers in genetic diversity estimation and gene pool classification of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Agric. Slovenica* 91, 87-96.
- Masi P., Logozzo G., Donini P. and Zeuli P. S. 2009 Analysis of genetic structure in widely distributed common bean landraces with different plant growth habits using SSR and AFLP markers. *Crop Sci.* 49, 187–199.
- Meirmans P. G. and Van Tienderen P. H. 2004. GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Mol. Ecol. Notes* 4, 792-794.
- Mercati F., Catarcione G., Paolacci A. R., Abenavoli M. R., Sunseri F., Ciaffi M. 2015. Genetic diversity and population structure of an Italian landrace of runner bean

(*Phaseolus coccineus* L.): inferences for its safeguard and on-farm conservation.

Genetica

Muruaga J. S., Cárdenas F. y Acosta J. A. 1992 Hibridación natural y métodos de polinización manual en *Phaseolus coccineus* L. In: Memoria de la XXXVIII Reunión Anual Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios y Animales. Managua, Nicaragua pp 307-311.

Muruaga M., J. S. 1996. Descripción varietal del frijol ayocote “Blanco Tlaxcala”. Desplegable para Productores. SAGAR-INIFAP-Fundación Produce Tlaxcala. Chapingo, Edo. Méx. 2 p.

Nowosielski J. W., Podyma W., Nowosielska D. 2002. Molecular research on the genetic diversity of Polish varieties and landraces of *Phaseolus coccineus* L. and *Phaseolus vulgaris* L. using the RAPD and AFLP methods. Cell. Mol. Biol. Lett. 7, 753-762.

Peakall R. and Smouse P. 2006 GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol. Ecol. Notes 6, 288-295.

Pérez P., Esquivel-Esquivel G., Rosales-Serna R. y Acosta J. A. 2002 Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México. Arch. Lat. Nutr. 52, 172-180.

Perrier X., Flori A. and Bonnot F. 2003 Data analysis methods. In: Hamon P., Seguin M., Perrier X. and Glaszmann J.C (eds) Genetic diversity of cultivated tropical plants. pp 43-76 Enfield Science Publishers, Montpellier.

Pritchard J.K., Stephens M. and Donnelly P. 2000 Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155, 945–959.

- Rajwant K. K., Rai M. K., Kalia S., Singh R. and Dawan A. K. 2011 Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177, 309-334.
- Ramakrishnan A. P., Meyer S. E., Water J., Stevens M. R., Coleman C. E., Fairbanks D. J. 2004. Correlation between molecular markers and adaptively significant genetic variation in *Bromus tectorum* (Poaceae), an inbreeding annual grass. *Amer. J. Bot.* 91, 797-803.
- Rodiño A. P., Lema M., Pérez-Barbeito M., Santalla M. and De Ron A. M. 2007 Assessment of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.) germplasm for tolerance to low temperature during early seedling growth. *Euphytica* 155, 63–70.
- Rodriguez M., Rau D., Angioi S. A., Bellucci E., Bitocchi E., Nanni L., Knüpffer H., Negri V., Papa R., Attene G. 2013. European *Phaseolus coccineus* L. landraces: population structure and adaptation, as revealed by cpSSRs and phenotypic analyses. *PLOS One* 8, e57337.
- Ruiz-Salazar R., Hernández-Delgado S., Vargas-Vázquez M. L. P., Muruaga-Martínez J. S., Mayek-Pérez N. 2010. Genetic diversity analysis of *Phaseolus coccineus* L. from Huasteco Karst of Mexico. *Bean Improv. Coop.* 53, 182–183.
- Santalla M., Monteagudo A. B., González A. M. and De Ron A. M. 2004 Agronomical and quality traits of runner bean germplasm and implications for breeding. *Euphytica* 135, 205–215.
- Spataro G., Tiranti B., Arcaleni P., Bellucci E., Attene G., Papa R., Zeuli P. S. and Negri V. 2011 Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theor. Appl. Genet.* 122, 1281-1291.

- Sicard D., Nanni L., Porfiri O., Bulfon D. and Papa R. 2005 Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus coccineus* L. landraces in central Italy. Plant Breed. 124, 464-472.
- Vargas-Vázquez M. L. P., Muruaga-Martínez J. S., Martínez S. E., Ruíz-Salazar R., Hernández-Delgado S., Mayek-Pérez N. 2011. Diversidad morfológica del frijol ayocote del Carso Huasteco de México. Rev. Mex. Biodiv. 82, 767-775.
- Vargas-Vázquez M. L. P., Muruaga-Martínez J. S., Lépiz-Ildelfonso R., Pérez-Guerrero A. 2012. La colección INIFAP de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) I. Distribución geográfica de sitios de colecta. Rev. Mex. Cienc. Agr. 3: 1247-1259.
- Vargas-Vázquez M. L. P., Muruaga-Martínez J. S., Pérez-Guerrero, A. 2013. Temperatura y precipitación de los sitios de colecta de variedades nativas de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.). Rev. Mex. Cienc. Agr. 4: 843-853.
- Vargas-Vázquez M. L. P., Muruaga-Martínez J. S., Mayek-Pérez N., Pérez-Guerrero A., Ramírez-Sánchez S. E. 2014. Caracterización de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) del Eje Neovolcánico y la Sierra Madre Oriental. Rev. Mex. Cienc. Agr. 5: 191-200.

Table 1. Origins of *Phaseolus* germplasm analyzed with SSR and AFLP markers.

<i>P. coccineus</i> from Veracruz	No.	*N	§W	°Altitude (masl)	Type of vegetation	<i>P. coccineus</i> from Puebla	No.	*N	§W	°Altitude (masl)	Type of vegetation
Acultzingo	20	18°45'00"	97°13'48"	2320	^b A	Chignahuapan	1	19°49'48"	98°03'00"	2260	C
Altotonga	15	19°46'12"	97°15'00"	2000	A	M. Tlatlauquitepec	1	19°52'12"	97°28'48"	2025	A
Jalapa	29	19°31'48"	96°55'12"	1460	^e B	Ávila Castillo	1	19°51'00"	97°27'00"	1860	A
C. Mendoza	6	18°48'00"	97°10'12"	1340	A	M. Serdán	3	18°58'48"	97°27'00"	2676	C
Jalacingo	3	19°48'00"	97°18'00"	1880	A	M. Zacapoaxtla	6	19°52'48"	97°34'48"	2045	A
Perote	5	19°34'12"	97°13'48"	2390	^λ C	Nauzontla	3	19°58'12"	97°36'00"	1400	B
Veracruz	29	19°31'48"	96°55'12"	1460	B	Tlatlauquitepec	5	19°52'12"	97°28'48"	2025	A
						Zacapoaxtla	10	19°52'48"	97°34'48"	2045	A
<u>Wild <i>P. coccineus</i></u>						<u>Controls</u>					
Tlaxcala	1	19°18'36"	98°12'00"	1050	C	P. Villa	1				
Morelos	1	19°01'48"	99°15'36"	2300	D	BAT 477	1				
Veracruz	1	18°09'36"	96°58'48"	1800	C	Pinto UI 114	1				
Estado de México	2	19°03'00"	100°01'48"	1800	D	<i>P. glabellus</i>	1				
Estado de México	1	19°27'00"	99°13'48"	2600	C	<i>P. lunatus</i>	1				
Distrito Federal	1	19°36'36"	99°12'00"	2500	C	<i>P. vulgaris</i>	7				
Oaxaca	1	16°55'48"	96°54'00"	2600	^l D	(Veracruz)					
Oaxaca	1	17°21'36"	96°31'48"	2039	D						
Oaxaca	1	17°49'48"	96°12'00"	420	D						
Nayarit	1	21°30'36"	104°52'48"	1860	A						
Michoacán	1	19°28'48"	101°19'48"	2110	A						
Michoacán	1	19°40'48"	101°57'36"	2100	A						
Querétaro	1	21°09'00"	99°09'00"	2450	C						
Hidalgo	1	19°57'36"	98°30'36"	2320	^o E						

*LN= North latitude; §LO=West longitude; °masl= meters above sea level; ^bA=Mixed forest of *Pinus-Quercus*; ^eB='Fog' forest with deciduous latifoliated plants; ^λC=Semi-desertic plants with latifoliated deciduous and perennial bush with predominating *Agave lechuguilla*; ^lD=Forest with deciduous latifoliated with trees lower than 15 m; ^oE=Arbustive savanna with herbaceous stratus.

Table 2. Sequences and traits of SSR markers used to analyze *Phaseolus* germplasm from Mexico.

SSR marker	Expected size (bp)	Motif	Primers	^z T _m (°C)
^y PH9B2	149	(CCT) ₇	5'-CCAACCACATTCTTCCCTACGTC-3' 5'-GCGAGGCAGTTATCTTTAGGAGTG-3'	49
PH3B4	139	(AT) ₄ (T) ₂ (A) T) ₆	5'-ACCTAGAGCCTAATCCTTCTGCGT-3' 5'-GAATGTGAATATCAGAAAGCAAATGG-3'	49
PH5B5	132	(AT) ₅	5'-CCGTTGCCTGTATTTCCCAT-3' 5'-CGTGTGAAGTCATCTGGAGTGGTC-3'	49
PH10B11	157	(CT) ₁₁	5'-GAGGGTGTTCCTACTATTGTCACTGC-3' 5'-TTCATGGATGGTGGAGGAACAG-3'	49
PH7B3	161	(AT) ₉	5'-AGTCGCCATAGTTGAAATTTAGGTG-3' 5'-CTTATTAACCGTGAGCATATGTATCATTC-3'	49
^u BM143	143	(GA) ₃₅	5'-GGGAAATGAACAGAGGAAA-3' 5'-ATGTTGGGAACCTTTTAGTGTG-3'	55
BM164	182	(GT) ₉ (GA) ₂₁	5'-CCACCACAAGGAGAAGCAAC-3' 5'-ACCATTCAGGCCGATACTCC-3'	52
BM181	192	(CT) ₁₇	5'-ATGCTGCGAGTTAATGATCG-3' 5'-TGAGGAGCAAACAGATGAGG-3'	50
BM210	166	(CT) ₁₅	5'-ACCACTGCAATCCTCATCTTTG-3' 5'-CCCTCATCTCCATTCTTATCG-3'	52
BM161	185	(GA) ₇ (GA) ₈	5'-TGCAAAGGGTTGAAAGTTGAGAG-3' 5'-TTCCAATGCACCAGACATTCC-3'	52
BM166	151	(CA) ₃ T (CA) ₇	5'-AAAGTGGGAGAGAAACACTACACC-3' GATGCTGGCTTTCCATTGAG-3'	52
BM170	179	(CT) ₅ CCTT (CT) ₁₂	5'-AGCCAGGTGCAAGACCTTAG-3' 5'-AGATAGGGAGCTGGTGGTAGC-3'	50
BM147	178	(CGA) ₄	5'-GGAACCAACAAGTTCCACTTAG-3' 5'-GAGACTGTGCTTTCCGACTC-3'	48
BM154	218	(CT) ₁₇	5'-TCTTGCGACCGAGCTTCTCC-3' 5'-CTGAATCTGAGGAACGATGACCAG-3'	50
GATs91	229	(GA) ₁₇	5'-GAGTGCGGAAGCGAGTAGAG-3' 5'-TCCGTGTTCTCTGTCTGTG-3'	53
GATs54	114	(GA) ₅ AACA GAGT(GA) ₈	5'-GAACCTGCAAAGCAAAGAGC-3' 5'-TCACTCTCCAACCAGATCGAA-3'	50

Data reported by Gaitán *et al.* (2002) and Sicard *et al.* (2005). ^zT_m= Annealing temperature; ^yPH=Primers for *P. coccineus*; ^uBM= Primers for *P. vulgaris*

Table 3. Amplified bands by AFLP primer combinations applied on *P. coccineus* germplasm from Mexico.

<i>EcoRI/MseI</i> primer combination	Bands		Total	Polymorphism (%)
	Polymorphic	Monomorphic		
ACC/ATC	100	14	114	87.7
AGG/ACT	80	5	85	94.1
ACA/ACC	74	16	90	82.2
ACC/ACT	65	13	78	83.3
ACA/ACG	72	18	90	80.0
AGG/ACC	66	6	72	91.7
Total/Mean	457	72	529	86.4

Table 4. AMOVA of 164 *Phaseolus* accessions analyzed with SSR and AFLP markers.

Source of variation	df	SS	MS	Explained variance	
				(%)	P<F
SSR markers					
Among populations	15	336	22.4	13.6	0.074
Among accessions	149	1369	9.2	55.5	0.340
Within accessions	163	763	4.7	30.9	0.389
Total	327	2468		100	
AFLP markers					
Among populations	15	3640	242.7	18.1	0.018
Among accessions	149	6469	43.4	32.2	0.302
Within accessions	163	10109	62.0	49.7	0.255
Total	327	20218		100	

Table 5. Genetic diversity indexes calculated by SSR locus.

SSR marker	NA	NEA	Ho	Hs	H _T	G _{IS}
<i>P. vulgaris</i> loci						
BM143	17	1.86	0.04	0.55	0.82	0.93
BM164	34	3.90	0.30	0.88	0.95	0.66
BM210	40	4.94	0.93	0.87	0.96	-0.07
BM154	41	3.87	0.35	0.87	0.94	0.60
BM181	37	3.83	0.34	0.87	0.93	0.61
BM147	41	5.50	0.81	0.91	0.96	0.11
BM161	32	3.84	0.76	0.84	0.92	0.10
BM166	16	2.51	0.55	0.69	0.86	0.20
BM170	25	2.39	0.46	0.69	0.81	0.33
GATS54	20	3.35	0.79	0.77	0.87	-0.02
GATS91	30	3.94	0.85	0.82	0.87	-0.04
Mean	30	3.63	0.56	0.80	0.90	0.31
<i>P. coccineus</i> loci						
PH10B11	32	4.07	0.45	0.88	0.94	0.49
PH3B4	32	3.13	0.20	0.82	0.94	0.75
PH5B5	36	3.01	0.23	0.83	0.93	0.72
PH7B3	39	4.34	0.54	0.89	0.94	0.39
PH9B2	14	2.47	0.01	0.73	0.88	0.99
Mean	31	3.40	0.29	0.83	0.93	0.67

NA= No. of alleles; NEA=No. of effective alleles, Ho= Heterozygosity observed; Hs= Heterozygosity within populations; H_T= Total Heterozygosity; G_{IS} = Endogamy coefficient. Pc = *P. coccineus*, Pv = *P. vulgaris*, Pg = *P. glabellus*, Pl = *P. lunatus*.

Table 6. Genetic diversity indexes calculated for SSR and AFLP marker analyses.

Population	SSR analysis						AFLP analysis	
	NA	NEA	Ho	Hs	H _T	G _{IS}	P (%)	DI
Veracruz								
Acultzingo	10	5.76	0.41	0.81	0.81	0.50	40	0.18
Altotonga	10	6.33	0.53	0.83	0.83	0.37	53	0.26
Jalapa	13	8.73	0.53	0.88	0.87	0.40	64	0.27
Cd. Mendoza	5	3.74	0.55	0.79	0.79	0.31	31	0.16
Jalacingo	3	2.92	0.49	0.76	0.76	0.36	20	0.12
Perote	4	3.18	0.48	0.68	0.67	0.30	32	0.17
Veracruz (Pc)	14	8.85	0.54	0.83	0.83	0.35	66	0.30
Mean	8	5.64	0.51	0.80	0.79	0.37	44	0.21
Puebla								
Huasteco Karst	3	2.78	0.39	0.78	0.78	0.51	21	0.12
Market Serdán	3	2.38	0.46	0.83	0.83	0.45	25	0.14
Market Zacapoaxtla	5	4.14	0.49	0.80	0.81	0.39	41	0.22
Nauzontla	3	2.57	0.42	0.70	0.73	0.41	25	0.14
Tlatlauquitepec	5	4.20	0.49	0.84	0.84	0.42	46	0.26
Zacapoaxtla	7	4.65	0.47	0.81	0.82	0.42	52	0.25
Mean	4	3.45	0.45	0.79	0.80	0.43	35	0.19
Controls								
Wild (Pc)	11	7.54	0.53	0.86	0.86	0.39	39	0.15
Controls (Pv cultivars, Pg, Pl)	5	4.80	0.44	0.93	0.92	0.53	51	0.26
Controls (Pv Veracruz)	6	4.38	0.44	0.77	0.76	0.43	29	0.15
Mean	7	5.57	0.47	0.85	0.85	0.45	40	0.19

NA= No. of alleles; NEA=No. of effective alleles, Ho= Heterozygosity observed; Hs= Heterozygosity within populations; H_T= Total Heterozygosity; GIS = Endogamy coefficient. Pc = *P. coccineus*, Pv = *P. vulgaris*, Pg = *P. glabellus*, Pl = *P. lunatus*.

Figure Legends

Figure 1. Dendrogram of 164 *Phaseolus* accessions by using 16 SSR loci (a) and six +3/+3 AFLP (b) primer combinations.

Figure 2. Graphs of population structure of scarlet runner bean with K=7 and K=8 where each color represent an individual population AC= Acultzingo; *JA= Jalapa; AL= Altotonga; VE= Veracruz; JA= Jalapa; PE= Perote and CM= Ciudad Mendoza. Control samples are P. Villa BAT477, Pinto UI114, *P. glabellus* and *P. lunatus*. Wild Forms are from of Southern of México. Membership coefficients were determined by 200,000 burn-ins and 800,000 replicates using the Structure software version 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000) with SSR data.

Figure 3. Graphs of population structure of scarlet runner bean with K=7 and K=8 where each color represent an individual population AC= Acultzingo; *JA= Jalapa; ALT= Altotonga; VE= Veracruz; JA= Jalapa; PE= Perote and CM= Ciudad Mendoza. Control samples are P. Villa BAT477, Pinto UI114, *P. glabellus* and *P. lunatus*. Wild Forms are from of Southern of México. Membership coefficients were determined by 200,000 burn-ins and 800,000 replicates using the Structure software version 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000) with AFLP data.

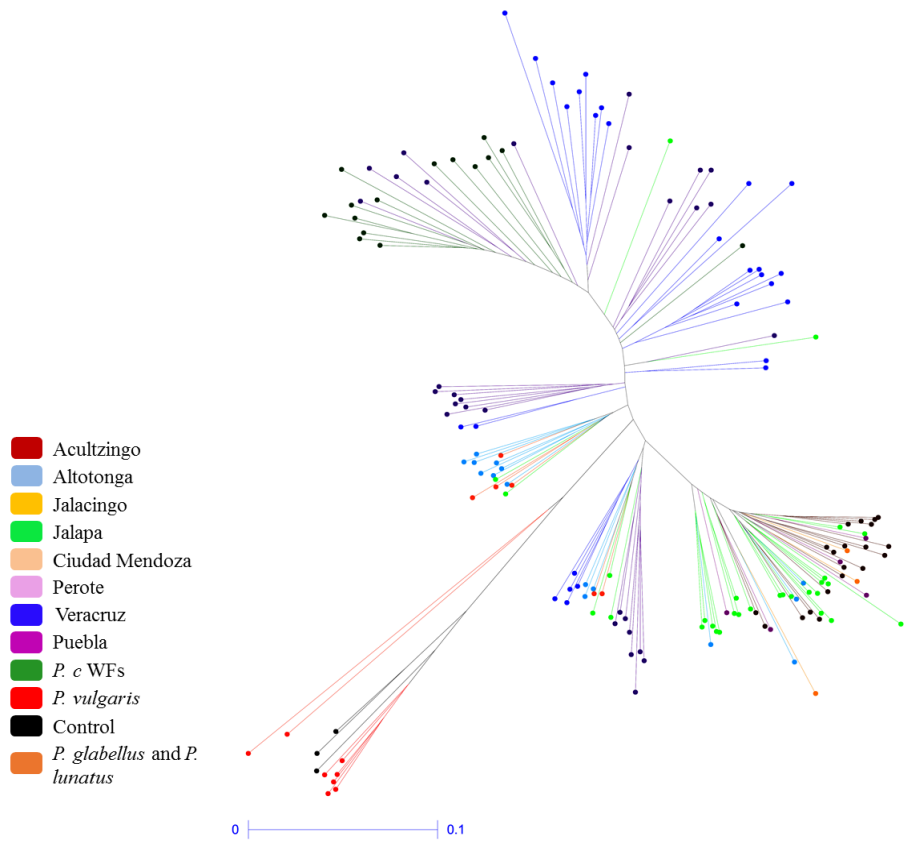
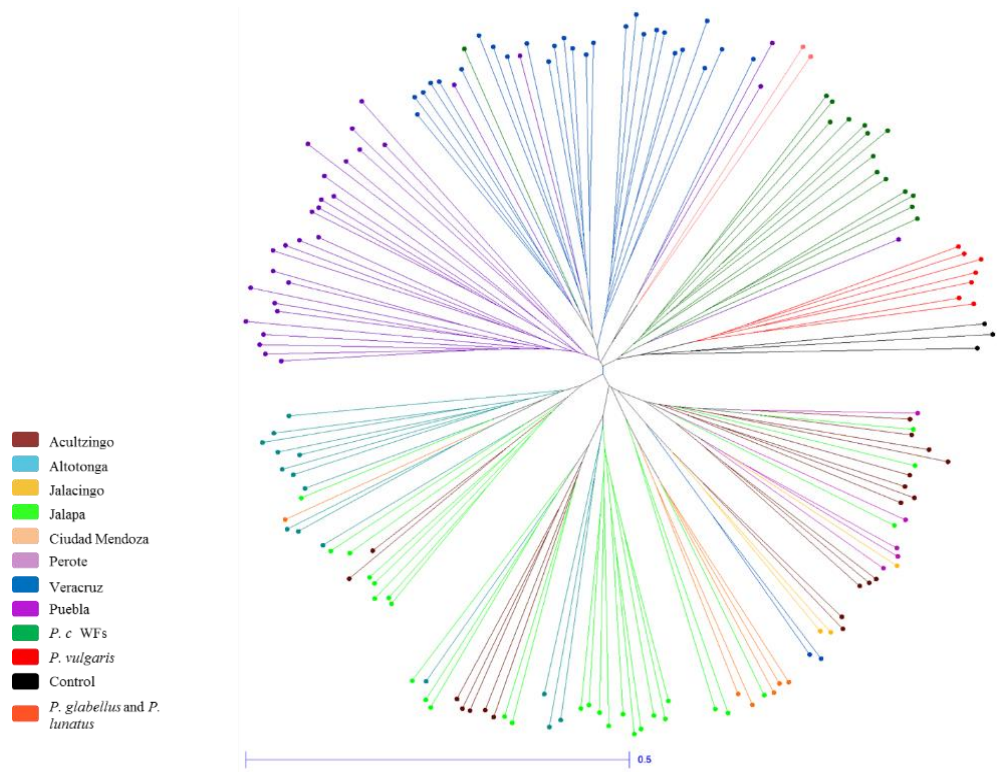


Fig 1.

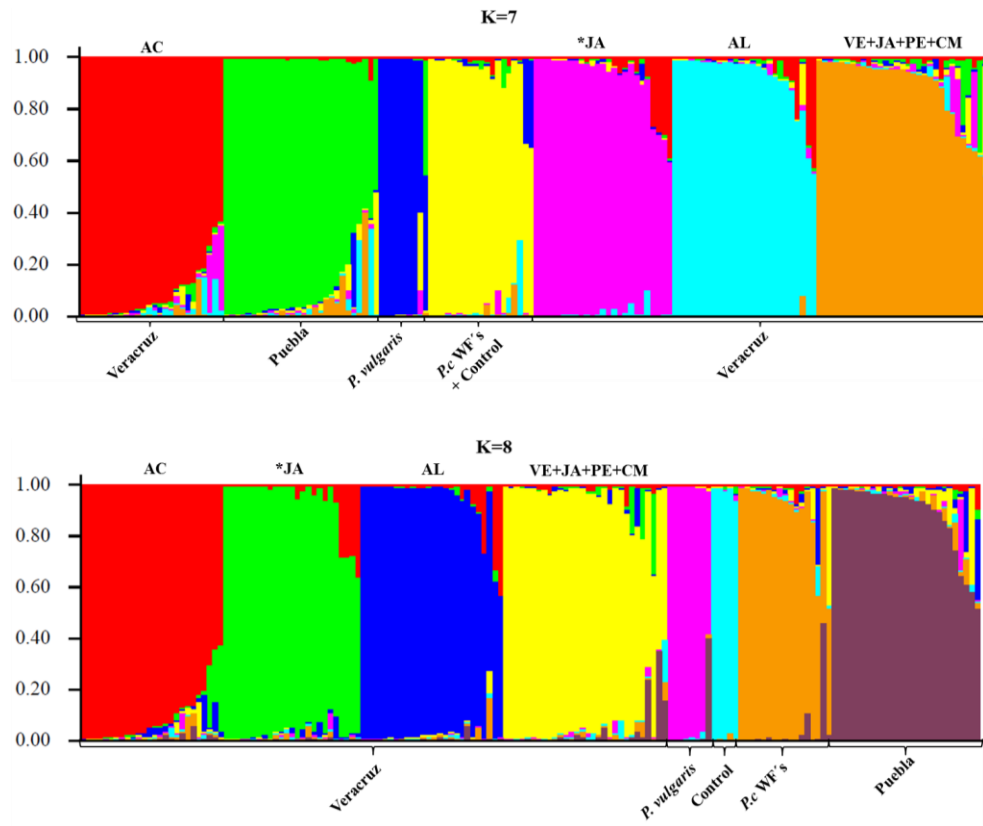


Fig 2.

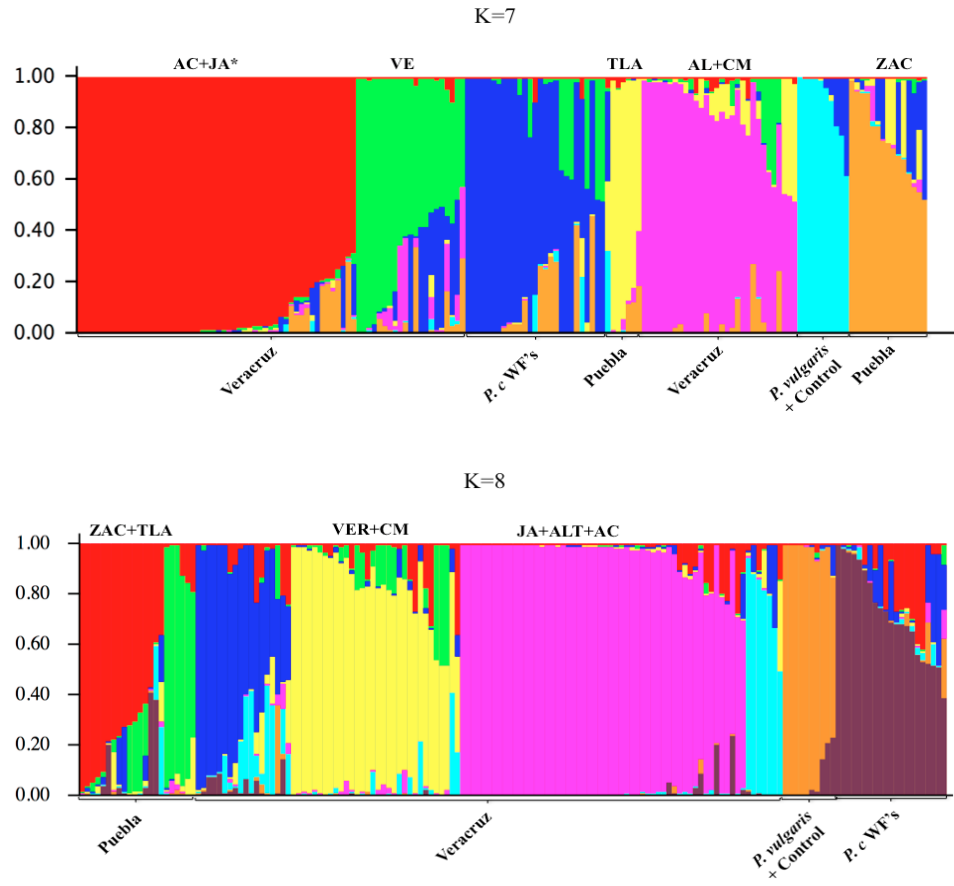


Fig 3.

7.3. Artículo de investigación: Ruíz-Salazar, R., J.S. Muruaga-Martínez, M.L.P. Vargas-Vázquez, G. Alejandro-Iturbide, G. Castañón-Nájera, S. Hernández-Delgado, N. Almaraz-Abarca, y N. Mayek-Pérez. 2016. Marcadores moleculares SCAR para identificar fuentes de resistencia a enfermedades en frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*).

Trabajo aceptado en la revista *Phyton International Journal of Experimental Botany*

1. Título principal (en letra minúscula)

Marcadores moleculares SCAR para identificar fuentes de resistencia a enfermedades en frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*)

2. Autores:

M.C. Régulo Ruíz-Salazar*¹, Centro de Biotecnología Genómica Instituto Politécnico Nacional (CBG-IPN); Ing. José Socorro Muruaga-Martínez²; M.C. María Luisa Patricia Vargas-Vázquez², Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias; Dr. Gabriel Alejandro-Iturbide⁴, Centro Interdisciplinario De Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Unidad Durango, Instituto Politécnico Nacional (CIIDIR-Durango); Dr. Guillermo Castañón-Nájera³, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; M.C. Sanjuana Hernández-Delgado¹, CBG-IPN; Dra. Norma Almaraz-Abarca⁴, CIIDIR-Durango; Dr. Netzahualcoyotl Mayek-Pérez¹, CBG-IPN.

Direcciones:

¹ Boulevard del Maestro, Esq. Elias Piña s/n Reynosa, Tamaulipas, C.P 88710

² Programa de Recursos Genéticos. Campo Experimental Valle de México. INIFAP. Carretera Los Reyes-Texcoco, km 13.5. A. P. 307. C. P. 56250. Coatlinchán, Texcoco, Estado de México

³ Carretera Villahermosa-Cárdenas, entronque Bosques de Saloya, kilómetro 0.5, Villahermosa, Tabasco, C.P. 86040, tel. 993-3-54-43-08

⁴ Calle Sigma #119, Fracc. 20 de Noviembre II, Durango Dgo., C.P. 34220

3. Resistencia a enfermedades en frijol (*Phaseolus* sp.).
4. Cuatro Cuadros y dos Figuras
5. Direcciones de correspondencia y e-mail del autor principal.

* Boulevard del Maestro, Esq. Elias Piña s/n Reynosa, Tamaulipas, C.P 88710, Teléfono +52 (834) 301 33 60, e-mail: rruizs0700@alumno.ipn.mx

6. Notas de pie de página.
7. El sistema operativo: Windows 7 y el procesador: Word.

Marcadores moleculares SCAR para identificar fuentes de resistencia a enfermedades en frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*)

SCAR molecular markers to identify disease resistance sources in ayocote beans (*Phaseolus coccineus*)

Resumen. Con el propósito de identificar fuentes de resistencia a las enfermedades Tizón común (TC), Virus del Mosaico Común del Frijol (BCMV), Virus del Mosaico Dorado del Frijol (BGMV) y Mancha angular (MA) que afectan al frijol (*Phaseolus*), se usaron nueve marcadores moleculares que detectan SCARs (sequence characterized amplified regions). Del total de marcadores cuatro fueron para TC, dos para BCMV, dos para BGMV y uno para MA. El material genético fueron 16 poblaciones de frijol ayocote (*P. coccineus*) colectadas en diferentes localidades de Veracruz y Puebla, México. Las poblaciones de Veracruz mostraron mayores frecuencias de SCAR para BGMV, BCMV, TC y MA que las de Puebla. Las mejores poblaciones pertenecientes a *P. coccineus* fueron Jalapa, Veracruz y Acultzingo (Veracruz); Nauzontla y Zacapoaxtla (Puebla). El análisis de conglomerados separó a las poblaciones de frijol evaluadas según la procedencia así como por la presencia de dos de los nueve marcadores amplificados (SU91 y LG5). Las poblaciones estudiadas, principalmente las de Veracruz, pueden utilizarse en programas de mejoramiento genético para generar poblaciones segregantes con genes de resistencia a las enfermedades que más afectan al frijol en México, ya que presentaron mayor frecuencia de SCARs.

Palabras clave: Especies de Frijol, marcadores moleculares, resistencia a enfermedades, Tizón común, Virus del mosaico común del frijol, Virus del Mosaico Dorado del Frijol, Mancha Angular del frijol.

Abstract. In order to identify genes of resistance to four diseases that affect diseases for Common Bacterial Blight (CBB), Bean Common Mosaic Virus (BCMV), Bean Golden Mosaic Virus (BGMV) and angular leaf spot (ALS) affecting the *Phaseolus* crop we amplified nine SCAR (sequence characterized amplified regions) markers: four linked to resistance to common blight, two for BCMV, two for BGMV and one for ALS. The genetic material were 16 ayocote bean (*P. coccineus*) populations collected from different locations at Veracruz and Puebla, Mexico. Populations from Veracruz showed greater number of SCARs for BGMV and ALS compared with populations from Puebla. The best *P. coccineus* populations were Jalapa, Veracruz and Acultzingo (Veracruz); Nauzontla, and Zacapoaxtla (Puebla). Cluster analysis separated the bean populations evaluated by geographical origin but mainly by the presence of two of the nine amplified markers (SU91 and LG5). The populations studied with emphasis from those of Veracruz should be used in breeding programs to generate segregating populations with genetic resistance to the major diseases of beans in Mexico, since they showed high frequencies of SCARs.

Keywords: Species Bean, Molecular Markers, disease resistance, Common Bacterial Blight, Bean Common Mosaic Virus, Bean Golden Mosaic Virus, Angular Leaf Spot.

Introducción

Una fuente de proteína para las poblaciones de bajos recursos y rurales es el frijol (*Phaseolus* sp.). La semilla de esta leguminosa contiene entre 20% y 28% de proteína, y sobresale por su abundancia la faseolina, que posee un alto contenido de lisina (1,69% a 2,44%), metionina (0,17% a 0,53%) y triptófano (14,00% a 0,22%). Además, son importantes los contenidos de vitaminas, minerales y fibra. Esta leguminosa se consume en países desarrollados y subdesarrollados, la faseolina se encuentra en mayor cantidad en el frijol que en los cereales (Barrios, 2011; Treviño y Rosas, 2013).

El género *Phaseolus* se conforma por 150 especies, de las cuales muchas de se encuentran en áreas tropicales del continente americano (Giurcă, 2009). En México se han identificado alrededor de 50 especies, y de éstas sólo 5 son cultivadas para consumo: el frijol común (*P. vulgaris* L.), el frijol ayocote ó frijol patol (*P. coccineus* L.), el frijol lima (*P. lunatus* L.), el frijol anual (*P. polyanthus* Greenm) y el frijol tépari (*P. acutifolius* Gray) (Debouck, 1991; Méndez-Águilar *et al.*, 2013; Treviño y Rosas, 2013). Después de *P. vulgaris* y *P. lunatus*, *P. coccineus*, es la tercera especie cultivada de frijol económicamente importante cultivada en todo el mundo (Spataro *et al.*, 2011; Porch *et al.*, 2013).

Restos arqueológicos de la forma cultivada de frijol ayocote se han encontrado en Mesoamérica y particularmente en México (Vargas *et al.*, 2102). En la República Mexicana el ayocote se cultiva como una planta anual o bianual, en monocultivo, o en superficie de 10 a 20 surcos por parcela junto al maíz o al frijol común (Vargas-Vázquez *et al.*, 2011). En México se conserva en condiciones de banco de germoplasma una

colección de frijol ayocote compuesta por 798 accesiones, que se clasificaron según las sub-provincias fisiográficas de origen (Vargas-Vázquez *et al.*, 2007).

El frijol destaca en el mundo por su importancia socioeconómica, por la superficie destinada para la siembra y la producción en grano (Porch *et al.*, 2013). Según el Comercio Internacional de Alimentos (IFT, 2014) la superficie sembrada y cosechada en primavera-verano 2013 y 2014 en la República Mexicana, incluyendo el área irrigada y de secano fue de 1.587.813 ha (2013) y 1.484.959 ha (2014), con rendimientos de 0,68 y 0,67 t ha⁻¹, respectivamente. El consumo per cápita en México se ubica en 11 kg (García, 2014). El frijol es un alimento importante para las zonas rurales y poblaciones urbanas de América Latina y África oriental y está ganando importancia en la población de los países desarrollados donde se busca mantener dietas saludables (Acosta-Gallegos *et al.*, 2007).

Esta leguminosa no deja de ser importante pues por ejemplo en México se registran 570 mil productores, de los cuales 65% cultiva frijol para autoconsumo y el 35% lo comercializa (García, 2014). La producción por hectárea en la República Mexicana es baja y se debe a que el 87% de la superficie de frijol se cultiva en condiciones de secano (IFT, 2014), por lo que la planta se encuentra expuesta durante su ciclo vital a factores abióticos como la sequía y bióticos como enfermedades.

La detección de genes que confieren resistencia a enfermedades puede realizarse mediante el uso de marcadores moleculares del ADN (Mienie *et al.*, 2005). De éstos, cabe señalar los SCARs ('sequence-characterized amplified regions'), son un tipo de marcador que amplifica secuencias ligadas a genes de resistencia y que por lo general

co-segrega junto al gen de interés ya que la distancia genética entre la secuencia SCAR y la secuencia del gen de resistencia generalmente no sobrepasa los 5 cM (centi Morgan) (Kelly *et al.*, 2003).

De las enfermedades virales que afectan al frijol, dos son transmitidas por áfidos: el virus del mosaico común del frijol (BCMV) y el virus del mosaico dorado del frijol (BGMV). El BCMV disminuye el rendimiento hasta en 80% dependiendo de la variedad, del estado de desarrollo en que se encuentren las plantas y las condiciones ambientales al momento de la infección (Castro *et al.*, 2001). El BGMV afecta significativamente la producción de frijol convirtiéndose, en la última década, en la mayor limitante para su cultivo en zonas bajas e intermedias de las regiones tropicales y subtropicales de América (Rosas, 1998). Rodríguez *et al.*, (2007) identificaron el marcador *bgm-1* que confiere resistencia al BGMV en líneas y variedades seleccionadas con buen comportamiento en campo. Por otro lado, Garrido *et al.* (2000) estudiaron la composición nucleotídica del BGMV y, además, detectaron germoplasma originario de Mesoamérica resistente al virus. Para el caso de Mancha Angular (MA) [*Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr.], Mahuku *et al.* (2004) señalan que provoca pérdidas del 50 al 80% en rendimiento de frijol al sembrar variedades susceptibles. Por su parte, la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterin, que provoca el tizón común (TC), reduce el rendimiento del frijol del 22 al 45% (Fourie *et al.*, 2011).

La presente investigación tuvo como objetivo identificar la presencia de marcadores tipo SCAR ligados a genes de resistencia a las enfermedades del frijol tizón

común, BCMV, BGMV y mancha angular, en poblaciones silvestres y cultivadas de *P. coccineus* de México.

Materiales y Métodos

En este trabajo se estudió germoplasma de frijol ayocote colectado en los estados de Veracruz y Puebla, México (Cuadro 1). El mismo incluye 152 accesiones de *P. coccineus* (137 cultivadas y 15 silvestres), así como siete accesiones de *P. vulgaris* cultivadas, tres variedades de *P. vulgaris* (Pinto Villa, BAT 477 y Pinto UI-114); una accesión de *P. glabellus* y una de *P. lunatus* (Cuadro 1; Fig. 1).

Extracción de ADN. Tres semillas de cada accesión se sembraron en charolas para germinación llenadas con Peatmoss (Premier®) y Perlita (Termolita®) en proporción 60:40, respectivamente. A los seis días después de la siembra se colectaron 40 mg de tejido fresco a partir de folíolos de las tres plantas de cada accesión. La extracción del ADN genómico se realizó con la solución comercial A1120 de Promega (Madison, WI, EEUU). Por último, las muestras se visualizaron en gel de agarosa al 1% con fotodocumentador Gel DocTM XR modelo Universal Hood II de *BIO-RAD* (Hércules, CA, EEUU). Después, el ADN se cuantificó con el software Quantity OneTM en fotodocumentador Gel DocTM. Los marcadores SCAR empleados, sus secuencias y genes a los que están ligados se muestran en la Cuadro 2.

Condiciones de la PCR. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador Perkin Elmer modelo GeneAmp 9800 Fast (Applied Biosystem®) en un

volumen de reacción de 15 µL. Las condiciones de la PCR (Cuadro 3) se ajustaron de acuerdo a las indicaciones sugeridas por el Bean Improvement Cooperative (BIC, 2010). Los productos de cada amplificación se revelaron en gel de agarosa al 1% preparado con TAE 1X (Tris acetato 40 mM; EDTA 1 mM) y se corrieron a 85 V con 180 mA por 45 min. Después, el gel se visualizó en luz UV con el software Quantity OneTM y el fotodocumentador Gel DocTM XR.

Análisis estadístico. Al final de la corrida se tomó una fotografía de cada gel para registrar los productos amplificados y construir una matriz binaria para cada SCAR, donde cero representó la ausencia del producto de amplificación y uno la presencia del producto de amplificación. Para la estimación de las distancias genéticas se usó el método de Dice (Nei & Li, 1979), el que se estima como:

$$\frac{2a}{(2a + b + c)}$$

Donde:

a= número total de bandas que son comunes en los individuos i y j (1,1)

b= número total de bandas que están presentes en el individuo i pero no en el j (1,0)

c= número total de bandas presentes en el individuo j pero no en el i (0,1)

Con la información del total de bandas de todas las poblaciones, se construyó una matriz de distancias genéticas con 5000 permutaciones. Luego se generó un dendrograma por el método UPGMA y distancias genéticas de Dice con el apoyo de los paquetes estadísticos Freetree y Treeview (Page, 1996).

Resultados

Los marcadores SR2, SW12 para BGMV y SNO2 para MA identificaron 9,04 y 8,5 bandas en promedio en las poblaciones de *Phaseolus* de Veracruz y Puebla, respectivamente (Cuadro 4), lo que indica alta frecuencia de resistencia a BGMV y MA. Las poblaciones Veracruzanas presentaron mayores frecuencias de marcadores SCAR (Cuadro 4), pues por ejemplo para TC y BCMV se observó un rango de 5,97 y 13,25 bandas amplificadas, respectivamente. Por el contrario en Puebla se presentó el promedio menor de SCARs asociados a TC (1,75) pero el mayor para BGMV (4,82).

De las poblaciones de Veracruz, las de Jalapa tuvieron el promedio de bandas mayor (21,20) para los nueve SCAR, y el menor se observó en Jalacingo (2,00). De las poblaciones de Puebla, los menores promedios se observaron en el Carso Huasteco (1,11) y los mayores en Nauzontla y Zacapoaxtla (7,78 y 6,11 bandas, respectivamente). El resto de las poblaciones de Puebla mostraron promedios bajos de SCARs amplificadas en comparación con los observados en las poblaciones de Veracruz.

El promedio de SCAR por especie y por estado también fue mayor en las poblaciones colectadas en Veracruz, con 9,96 SCARs para *P. coccineus* y 4,33 para *P. vulgaris*. En contraste, para Puebla se detectaron 3,79 SCARs en *P. coccineus* cultivado, 2,00 SCARs en *P. coccineus* silvestre de Banco de germoplasma y 2,44 en las poblaciones comerciales de Puebla.

El análisis de conglomerados (Fig. 2) separó al germoplasma en cuatro grupos de accesiones. El primero incluyó poblaciones de Tlatlauquitepec, Nauzontla, Mercado

Zacapoaxtla, Mercado Serdán, Carso Huasteco y Perote, que pertenecen a *P. coccineus*. El segundo grupo se constituyó con poblaciones de Veracruz (Veracruz, Ciudad Mendoza y Jalacingo). En el tercer grupo exhibió poblaciones comerciales de Puebla y los testigos *P. vulgaris*, *P. glabellus* y *P. lunatus* y poblaciones de Jalapa, Acultzingo y Altotonga (*P. coccineus*). Finalmente, el cuarto grupo presentó poblaciones de Zacapoaxtla (*P. coccineus* cultivados), *P. coccineus* silvestre de Banco de Germoplasma y *P. vulgaris* de Veracruz. La formación de los grupos no se asoció en la especie o el sitio de colecta de cada accesión sino que, principalmente, dependió de las frecuencias de presencia de SCARs tales como SU91 y LG5, que identifican la resistencia al TC.

Discusión

La incorporación de resistencia genética simple y/o múltiple a las enfermedades de importancia económica en cada región agroecológica donde se produce frijol se basa en la búsqueda constante de nuevas fuentes de resistencia y su incorporación a los programas de cruzamiento, evaluación y selección de germoplasma segregante en condiciones de campo y/o controladas. Todo ello con el objetivo fundamental de obtener germoplasma con resistencia a dicho factor adverso, rendimientos altos y estables y, si es posible, con características de calidad superiores (Acosta-Gallegos *et al.*, 2007; Anaya-López *et al.*, 2015a). Por añadidura se esperan otros efectos positivos, tales como la reducción de la contaminación del ambiente al reducir el uso de agroquímicos y garantizar los rendimientos en diversos sistemas de producción, sobre todo en los de subsistencia (López-Salinas *et al.*, 2002).

El empleo de selección asistida por marcadores moleculares es una herramienta eficaz ante la selección tradicional en donde el rendimiento puede no ser notorio, pues en ello influyen diversos factores por tratarse de rasgos complejos y depender de varios componentes. Por lo tanto, la comprensión de la asociación de características deseables son cruciales en el desarrollo de un programa de mejoramiento vegetal eficiente, cuyo objetivo es desarrollar variedades estables y de alto rendimiento (Kiryowa *et al.*, 2015; Anaya-López *et al.*, 2015b).

Mientras que en países como Estados Unidos la SAMM se usa recurrentemente para incorporar genes y acelerar la obtención de germoplasma con resistencia genética (Miklas *et al.* 2006); en México la SAMM en frijol recién comienza, pues a la fecha sólo una variedad liberada bajo dicho esquema se ha producido ('Dalia') (Acosta-Gallegos *et al.*, 2014), con resistencia a BCMV y BMCNV (virus del mosaico común del frijol y raíz negra o necrosis). Sin embargo, una dificultad recurrente es que, por ejemplo, Duncan *et al.* (2012) utilizaron el SCAR SU91 para detectar resistencia a TC y mencionan que un solo SCAR no es suficiente para proveer suficiente resistencia a determinado patógeno, sugiriéndose por lo menos el manejo de dos SCARs a la vez, o mejor aún, la piramidación de genes de resistencia (Anaya-López *et al.*, 2015a, b).

Las diferencias encontradas en cuanto a cuáles genes de resistencia se presentan, en qué poblaciones de Veracruz y Puebla y en qué proporciones, son similares a lo indicado por Acosta y Navarrete (1996) y Cruz *et al.* (2004), quienes afirman que algunos genotipos pueden mostrarse como resistentes en una región o país, y susceptibles en otras. También, la resistencia que presentan genotipos clasificados como resistentes puede ser inestable; esto confirma que existe una alta especificidad de la

interacción entre los genotipos del patógeno y del hospedante (Cruz *et al.*, 2004; Rodríguez-Miranda y Rosas-Sotomayor, 2010). En general, mayores frecuencias de SCARs de resistencia a TC, BCMV y MA se observaron en germoplasma de Veracruz. Diversos trabajos han enfatizado mayores incidencias y daños por las tres enfermedades en frijol cultivado en Veracruz en comparación con Puebla. Las mayores presiones de selección por las condiciones ambientales favorables para la mayor incidencia de enfermedades y de inóculo primario y mayor patogenicidad en los aislamientos de Veracruz (Mahuku *et al.*, 2002; Lepe-Soltero *et al.*, 2012; Francisco-Francisco *et al.*, 2013; Anaya-López *et al.*, 2015a), posiblemente han llevado a los agricultores de dicho estado de Veracruz a seleccionar empíricamente por mayor resistencia a enfermedades y, por consiguiente, el incremento de la frecuencia de genes de resistencia en las mismas

El marcador SR2 detecta al gen *bgm-1* y el marcador SW12 está asociado con el gen *I* ambos confieren resistencia al BGMV (Blair *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2000) en el presente trabajo se obtuvo un promedio para ambos marcadores de 13,25 para Veracruz y sólo 4,82 para Puebla. Por su parte Osorno *et al.* (2007) indicaron que la resistencia al BGMV en *P. coccineus* es controlada por los genes *bgm-3* (recesivo) y *Bgp-2* (dominante) y ambos son detectados mediante el SCAR SR2.

En cuanto a detección de resistencia a TC Durham *et al.* (2013) y Muhamba *et al.* (2014) establecen que el SCAR SU91 está ligado únicamente a un QTL de resistencia a TC. Fourie & Herselman (2011) informan que de los marcadores SCAR usados en su investigación fueron el SU91 y SAP6 y tienen uso potencial en el programa de mejoramiento de frijol en Sudáfrica. Así mismo el SCAR BAC6 ha demostrado ser un marcador confiable en la identificación de resistencia (QTL BC409) a TC. En el

presente estudio se encontró que dicho marcadores se encontraron con mayor frecuencia en las poblaciones de Veracruz que en las de Puebla (4,37 contra 0,25).

Por otro lado, López *et al.* (2006) en la variedad de *P. vulgaris* ICTA Ju 97-1 detectaron resistencia al BCMV. Sin embargo a la fecha no existen reportes de este tipo de ensayos en accesiones de *P. coccineus*. Para el caso de las accesiones de ayocote de Veracruz y Puebla los valores promedio de amplificación de SCAR para detectar resistencia al BCMV fueron de 10,25 y 4,75 respectivamente.

Por último en México se ha detectado resistencia a MA en condiciones de campo en un ensayo de rendimiento y reacción a enfermedades con cultivares de frijol común (Acosta *et al.*, 2010) pero no en accesiones de ayocote. Mientras que contrario a lo anterior Busogoro *et al.* (1999) inocularon con 54 aislamientos de *P. griseola* (MA) 29 genotipos tanto de silvestres como cultivados de *P. vulgaris*, *P. coccineus* y *P. polyanthus* sus resultados indican que la accesión NI666 de *P. coccineus* es resistente al total de los aislados de MA probados lo que concuerda con los resultados encontrados en el presente trabajo pues el SCAR SN02 se encontró en promedio 12,5 veces para las accesiones de *P. coccineus* de Veracruz y 4,5 para las de Puebla.

Los patrones de agrupamiento del germoplasma se basaron en la presencia de SCARs SU91 y LG5 para TC en las poblaciones evaluadas. Así, por ejemplo, las poblaciones que formaron el grupo de Tlatlauquitepec, Mercado Zacapoaxtla, Mercado Serdán, Carso Huasteco y Perote, no presentan ninguno de los dos SCAR mencionados, sólo Nautontla que también es de este grupo presentó amplificación de banda para el SCAR LG5. En cambio, en las poblaciones Veracruz, Ciudad Mendoza y Jalacingo, se

pudo detectar el SCAR SU91. Por otro lado, SU91 y LG5, fueron identificados en las cuatro poblaciones, Puebla Comerciales, Jalapa, Acultzingo y Altotonga. Mientras que en las poblaciones Zacapoaxtla, VeracruzPv y Banco de Germoplasma no está presente SU91, pero sí LG5, aunque en la última población de este grupo, no se detectó ninguno de los SCAR referidos.

El mejoramiento genético tradicional se basa en la identificación, selección con base en fenotipos y la posterior introgresión de los caracteres deseados para el desarrollo de germoplasma superior. Esto se ha hecho recurrentemente por ejemplo para mejorar los rasgos agronómicos importantes como rendimiento de grano, fenología o calidad, así como para la obtención de resistencia a enfermedades, plagas, sequía o salinidad. Este proceso dura usualmente entre 5 y 8 años, o incluso más. Los tiempos y los costos se pueden reducir con la utilización de la selección asistida por marcadores moleculares de ADN (Collard & Mackill, 2008; Bernardo, 2008; Xu & Crouch, 2008).

A la fecha es patente el uso de estrategias de marcadores moleculares ‘tradicionales’ tales como los RFLPs, RAPDs, AFLPs o SSRs en frijol y casi en cualquier especie vegetal cultivada para la caracterización de la diversidad genética, la estructuración de mapas de ligamiento y el mapeo de genes ‘mayores’ o de QTLs asociados con la resistencia a factores adversos y el apoyo en la SAMM. Fue frecuente obtener, en el caso del mapeo, mapas genéticos a partir de cruzamientos amplios y que no fueron lo suficientemente densos o bien, que no fueron consistentes entre poblaciones o acervos genéticos (Kelly *et al.*, 2003; Miklas *et al.*, 2006). Una alternativa a ello fue el uso de diferentes tipos de poblaciones segregantes adicionales a la F₂, tales como las líneas casi isogénicas, líneas endogámicas retrocruzadas o las líneas endogámicas

recombinantes y la combinación con análisis de segregantes en grupos (Miklas *et al.*, 1996). La conversión de un marcador molecular a SCAR facilita la SAMM (Miklas *et al.*, 2006) pero su eficiencia en el mejoramiento genético se reduce dada la condición dominante del marcador, la presencia de ligamiento en fase de repulsión entre los marcadores y los rasgos dominantes, la necesidad de las pruebas de progenie o los cambios en la especificidad de los marcadores a grupos de ligamiento, tipos comerciales de grano y/o acervos genéticos (Bello *et al.*, 2014).

Los resultados de este trabajo alientan la continuación del mismo, en el sentido del manejo genético correspondiente que apoye el uso de las posibles fuentes de resistencia en el mejoramiento genético de *Phaseolus*, particularmente para las regiones tropicales y sub-tropicales de México. A la par de ello, es indispensable saber que el desarrollo de estrategias de marcadores moleculares sigue y cada nueva opción debe evaluarse y probarse, tal es el caso de la secuenciación de nueva generación (Bolger *et al.*, 2014) que aprovecha polimorfismos derivados de secuencias simples repetidas (SSRs), inserciones-delecciones (InDels) o polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) con la base de secuencias genómicas de referencia recién liberadas (Schmutz *et al.*, 2014) para asignar las posiciones genómicas físicas e identificar genes candidatos. Otra estrategia se fundamenta en combinar el análisis de segregantes en grupos y el de perfiles transcripcionales de datos RNA-secuenciación en el mapeo de QTLs y de mutantes (Viteri *et al.*, 2014). Lo anterior ha obligado a generar plataformas de alto rendimiento para el análisis genómico integral (BeanCAP, Langebio) (Saburido-Álvarez y Herrera-Estrella, 2015; Mukeshimana *et al.*, 2014). Finalmente, se propone el análisis de segregantes en grupo ‘*in silico*’ que en esencia consiste en detectar variaciones de

SNPs entre individuos con fenotipo y genotipo definido en regiones genómicas específicas. Así se podría sortear la necesidad de desarrollar poblaciones de mapeo o analizar genéticamente la población original en la que el gen o el QTL se identificó (Bello *et al.*, 2014).

Conclusiones

Los SCAR usados en el estudio fueron efectivos para amplificar la secuencia ligada al gen de resistencia a las enfermedades que identifica cada uno de ellos.

Las poblaciones evaluadas de *P. coccineus* son reservorio de genes valiosos de resistencia a las cuatro enfermedades que identifican los SCAR usados en esta investigación.

Las poblaciones de Veracruz poseen en promedio ocho SCAR más que las de Puebla, principalmente para resistencia al Virus del mosaico dorado (BGMV) y la Mancha angular (MA).

El germoplasma evaluado puede ser usado en programas de mejoramiento genético, para incorporar resistencia genética en genotipos de interés.

Agradecimientos

RRS agradece al CONACYT de México la beca doctoral no. 210061 así como el apoyo a ayudante de investigador nacional no. 11002. También, agradece al Gobierno

del estado de Tamaulipas, al programa PIFI del IPN y al Programa Santander ECOES por las becas otorgadas para llevar a cabo sus estudios doctorales. Los autores agradecen las becas institucionales con las que son honrados (SNI, COFAA-IPN, EDI-IPN, Desempeño Académico-UJAT). Este trabajo fue financiado por los apoyos de CONACYT-Ciencia Básica (clave 181756); FOMIX-Gobierno del Estado de Veracruz (no. 94070) y Multidisciplinario IPN 2014-2015 (no. 1636).

Referencias

- Acosta, G.J.A. y R. Navarrete M (1996). Search for multiple disease resistance common bean. *Bean Improvement Cooperative* 39: 47-59.
- Acosta-Gallegos, J. A., J. D. Kelly & P. Gepts (2007). Prebreeding in common bean and use of genetic diversity from wild germplasm. *Crop Science* 47(3): 44-59.
- Acosta, G.J.A, B. M. Sánchez G, F. M. Mendoza H, Y. Jiménez H, R. Salinas P. R. Rosales S, R. Navarrete M, R. Zandate H, S. Alvarado M y J. S. Padilla (2010). Rendimiento y reacción a enfermedades en frijol tipo Flor de Mayo en riego y temporal. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1(1): 65-75.
- Acosta-Gallegos, J.A., V. Montero-Tavera, Y. Jiménez-Hernández, J.L. Anaya-López, M.M. González-Chavira (2014). ‘Dalia’, a new variety of bean grain, Flor de Junio type for the central region of Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5(2). 331-336.

- Anaya-López, J.L., L. Silva-Rosales, V. Montero-Tavera, F. Espejel, J.A. Acosta-Gallegos, (2015a). Retos y oportunidades en la selección asistida de frijol resistente a BCMV y BCMNV en México. I. Dimensión del problema. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6(3): 453-465.
- Anaya-López, J.L., F. Espejel, V. Montero-Tavera, J.A. Acosta-Gallegos, L. Silva-Rosales (2015b). Retos y oportunidades en la selección asistida de frijol resistente a BCMV y BCMNV en México. II. Oportunidades para la selección asistida. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6(3): 495-507.
- Barrios, M.R.P. (2011). Identificación de QTLs asociados a características agronómicas de interés, en una retrocruza avanzada de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de Bióloga. Universidad del Tolima, Facultad de Ciencias, Programa de Biología, Ibagué-Tolima, 128 p.
- BIC (2010). SCAR markers linked with disease resistance traits in common bean (*Phaseolus vulgaris*). Bean Improvement Cooperative. Disponible en: http://bic.css.msu.edu/pdf/SCAR_Markers_2010.pdf [Fecha de consulta: 11 de febrero de 2015].
- Bello, M.H., S.M. Moghaddam, M. Massoudi, P.E. McClean, P.B. Cregan, P.N. Miklas (2014). Application of *in silico* bulked segregant analysis for rapid development of markers linked to Bean common mosaic virus resistance in common beans. *BMC Genomics* 15: 903.

- Bernardo, R. (2008). Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years. *Crop Science* 48: 1649-1664.
- Blair, M.W., L. M. Rodriguez, F. Pedraza & S. Beebe (2007). Genetic mapping of the bean golden yellow mosaic geminivirus resistance gene *bgm-1* and linkage with potyvirus resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 114: 261-271.
- Bolger, M.E., B. Weisshaar, U. Scholz, N. Stein, B. Usadel, F.X. Mayer (2014). Plant genome sequencing – applications for crop improvement. *Current Opinion in Biotechnology* 26: 31-37.
- Busogoro, J.P., M.H. Jijakli & P. Lepoivre (1999). Identification of a novel source of resistance to angular leaf spot disease of common bean within the secondary gene pool. *Plant Breeding* 118: 417-423.
- Castro, A., J. C. Rosas, L. Aranda (2001). Aplicación de los marcadores moleculares para la caracterización de la biodiversidad y el mejoramiento genético de plantas. (intranet). Zamorano, HN. Zamorano. Disponible en [http://clases/bin/frame.pl/?/](http://clases/bin/frame.pl?/)
Consultado 18 de Diciembre de 2014.
- Collard, B.C.Y. & D.J. Mackill (2008). Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society of Biological Sciences* 363(1491): 557-572.
- Cruz, I.C., P. Ramírez, R. García, F. Castillo y J.S. Sandoval (2004). Selección para resistencia a tizón común en frijol. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27(2): 144-147.

- Debouck, D.G. (1991). Systematics and morphology. En: A. van Schoonhoven and O. Voyset (ed.) Common beans: Research for crop improvement. C.A.B. Intl., Wallingford, UK and CIAT, Cali, Colombia, pp. 55-118.
- Duncan, R.W., R.L. Gilbertson & S.P. Singh (2012). Direct and marker-assisted selection for resistance to common bacterial blight in common bean. *Crop Science* 52: 1511-1521.
- Durham, K.M., W. Xie, K. Yu, K. Peterpauls, E. Lee & L. Navabi (2013). Interaction of common bacterial blight quantitative trait loci in a resistant inter-cross population of common bean. *Plant Breeding* 132: 658-666.
- Fourie, D. & L. Herselman (2011). Application of molecular markers in breeding for bean common blight resistance in South Africa. *African Crop Science Journal* 19(4): 369-376.
- Fourie, D., L. Herselman & C. Mienie (2011). Improvement of common bacterial blight resistance in southafrican dry bean cultivar teebus. *African Crop Science Journal* 19(4): 377-386.
- Francisco-Francisco, N., G. Gallegos-Morales, Y.M. Ochoa-Fuentes, F.D. Hernández-Castillo, A. Benavides-Mendoza, F. Castillo-Reyes (2013). Aspectos Fundamentales del Tizón Común Bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): Características, Patogenicidad y Control. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31(2):147-160.

- García, S.A. (2014). Insuficiente en México la producción de frijol. Disponible en: <http://www.eldiariodecoahuila.com.mx/notas/2013/10/30/insuficiente-mexico-produccion-frijol-395641.asp> Fecha de consulta 14/12/2014.
- Garrido-Ramírez, E.R., M.R. Sudarshana & R.L. Gilbertson (2000). Bean golden yellow mosaic virus from Chiapas, Mexico: Characterization, Pseudorecombination with Other Bean-Infecting Geminiviruses and Germ Plasm Screening. *Phytopathology* 90(11): 1224-1232.
- Giurcă, D.M. (2009). Morphological and phenological differences between the two species of the *Phaseolus* genus (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*). *Cercetări Agronomice în Moldova* 42(2): 39-45.
- IFT (2014). México: cosecha de frijoles primavera-verano 2014. International Food Trader Disponible en: <https://www.goift.com/translations/141006-espanol-mexico-cosecha-de-frijoles-primavera-verano-2014-kutnowski/> Fecha de consulta 14/12/2014.
- Kelly, J.D., P. Gepts, P.N. Miklas, D.P. Coyne (2003). Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crops Research* 82: 135-154.
- Kiryowa, M., S.T. Nkalubo, C. Mukankusi, H. Talwana, P. Gibson & P. Tukamuhabwa (2015). Effect of marked aided pyramiding of anthracnose and *Phytophthora* root rot resistance genes on plant agronomic characters among advanced common bean genotypes. *Journal of Agricultural Sciences* 7(3): 98-104.

- Lepe-Soltero, D., B.M. Sánchez-García, Y. Jiménez-Hernández, R.A. Salinas-Pérez, M.A. García-Neria, D. González—De León, E.N. Becerra-Leor, J.A. Acosta-Gallegos, L. Silva-Rosales (2012). Presence of BCMV and BCMNV in five dry bean-producing states in Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 15:313-321.
- López, S.E., O.H. Tosquy V, B. Villar S, E. N. Becerra L, F. J. Ugalde A y J. Cumpián G (2006). Adaptabilidad de genotipos de frijol resistentes a enfermedades y a suelos ácidos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 29 (1): 33–39.
- López-Salinas, E., E. N. Becerra-Leor, O. Cano-Reyes, y V. O. López-Galván (2002). Detección de Líneas y Variedades de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con Resistencia Múltiple a Enfermedades en el Trópico Húmedo de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20(2): 193-199.
- Mahuku, G., C. Jara, J.B. Cuasquer, G. Castellanos (2002). Genetic variability within *Phaeoisariopsis griseola* from Central America and its implications for resistance breeding in common bean. *Plant Pathology* 51(5): 594-604.
- Mahuku, G., C. Montoya, M.A. Henríquez, C. Jara, H. Teran & S. Beebe (2004). Inheritance and characterization of angular leaf spot resistance gene present in common bean accession G 10474 and identification of an AFLP marker linked to the resistance gene. *Crop Science* 44: 817-824.
- Méndez-Aguilar, R., M.H. Reyes V y N. Mayek (2013). Avances y perspectivas sobre el mapeo genético de la resistencia a las pudriciones de raíz en frijol común. *phyton* 82: 215-226.

- Mienie, C.M.S., M.M. Liebenberg, Z.A. Pretorius & P.N. Miklas (2005). SCAR markers linked to the common bean rust resistance gene Ur-13. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 972-979.
- Miklas, P.N., E. Johnson, V. Stone, J.S. Beaver, C. Montoya, M. Zapata (1996). Selective mapping of QTL conditioning disease resistance in common bean. *Crop Science* 36: 1344-1351.
- Miklas, P.N., J.D. Kelly, S.E. Beebe, M.W. Blair (2006). Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding. *Euphytica* 147: 105-131.
- Muhamba, T.G., L. Amos Ch, D. Protas, P. Mbogo K & S. Nchimbi-Msolla (2014). Marker Assisted Selection for Common Bean Diseases Improvements in Tanzania: Prospects and Future Needs. Ch. 5, p. 121-147. <http://dx.doi.org/10.5772/52823> Fecha de consulta, 13/12/2014.
- Mukeshimana, G., I. Butare, P.B. Cregan, M.W. Blair, J.D. Kelly (2014). Quantitative trait loci associated with drought tolerance in common bean. *Crop Science* 54: 923-938.
- Nei, M., & W. H. Li (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 76: 5269-5273.
- Osorno, J. M., C. G. Muñoz, J. S. Beaver, F. H. Ferwerda, M. J. Bassett, P. N. Miklas, T. Olczyk & B. Bussey (2007). Two Genes from *Phaseolus coccineus* Confer

- Resistance to Bean Golden Yellow Mosaic Virus in Common Bean. *Journal of American Society of Horticultural Sciences* 132(4): 530-533.
- Page, R.D.M. (1996). Freetree, TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Appl Biosci.* 12: 357-358.
- Porch, T.G., J.S. Beaver, D.G. Debouck, S.A. Jackson, J.D. Kelly & H. Dempewolf (2013). Use of Wild Relatives and Closely Related Species to Adapt Common Bean to Climate Change. *Agronomy* 3: 433-461
- Rodríguez-Miranda, O. y J.C. Rosas-Sotomayor (2010). Selección de genotipos de frijol común por su resistencia al tizón bacteriano. *Agronomía Mesoamericana* 21(2): 275-280.
- Rodríguez, M.O., B. Faure, Á.R. Benítez y S.E. Beebe (2007). Identificación de genotipos resistentes al virus de mosaico dorado amarillo del frijol (BGYMV) mediante el uso del marcador molecular *bgm-1*. *Temas de Ciencia y Tecnología* 11(33): 57-63.
- Rosas, J.C. (1998). El cultivo del frijol común en América Tropical. Zamorano, HN, Zamorano. *Academic Press*. 52 p.
- Saburido-Álvarez, M.S. y A. Herrera-Estrella (2015). El frijol en la era genómica. *Revista Digital Universitaria*. 16(2): 1-16.
- Schmutz, J., P.E. McClean, S. Mamidi, G.A. Wu, S.B. Cannon, J. Grimwood, J. Jenkins, S. Shu, Q. Song, C. Chavarro, M. Torres-Torres, V. Geffroy, S.M. Moghaddam, D. Gao, B. Abernathy, K. Barry, M. Blair, M.A. Brick, M. Chovatia, P. Gepts, D.M. Goodstein, M. Gonzales, U. Hellsten, D.L. Hyten, G. Jia, J.D. Kelly, D.

- Kudrna, R. Lee, M.M.S. Richard, P.N. Miklas, *et al.* (2014). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics* 46: 707-713.
- Spataro, G., B. Tiranti, P. Arcaleni, E. Bellucci, G. Attene, R. Papa, P. Spagnoletti & V. Negri (2011). Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theoretical and Applied Genetics* 122: 1281-1291.
- Singh, S.P., F.J. Morales, P.N. Miklas & H. Terán (2000). Selection for Bean Golden Mosaic Resistance in Intra- and Interracial Bean Populations. *Crop Science* 40: 1565-1572.
- Treviño, Q.C. y R. Rosas (2013). El frijol común: factores que merman su producción. Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana. Volumen XXVI Número 1. Disponible en: <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol26num1/articulos/el-frijol.html>
Fecha de consulta 13/12/2014.
- Vargas V, M.L.P., J.S. Muruaga, R. Lépiz y A. Pérez (2012). La colección INIFAP de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) I. Distribución geográfica de sitios de colecta. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3(1): 1247-1259.
- Vargas-Vázquez, M.L.P., J.S. Muruaga-Martínez, J.M. Hernández-Casillas y J. Díaz-De la Cruz (2007). Diagnóstico de la forma cultivada del frijol ayocote *Phaseolus coccineus* L. e información geográfica de los sitios de colecta. Campo Experimental Valle de México, INIFAP, Chapingo, Estado de México. 18 p.

- Vargas-Vázquez, M.L.P., J.S. Muruaga-Martínez, S.E. Martínez-Villarreal, R. Ruiz-Salazar, S. Hernández-Delgado y N. Mayek-Pérez (2011). Diversidad morfológica del frijol ayocote del Carso Huasteco de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 767-775.
- Viteri, D., P. Cregan, J. Trapp, P. Miklas, S. Shree (2014). A new common bacterial blight resistance QTL in VAX 1 common bean and interaction of the new QTL, SAP6, and SU91 with bacterial strains. *Crop Science* 54: 1598-1608.
<http://dx.doi.org/10.2135/cropsci2014.01.0008>
- Xu, Y. & J.H. Crouch (2008). Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. *Crop Science* 48: 391-407.

Cuadro 1. Origen, población, especie y número de accesiones de *Phaseolus* sp., usadas en el análisis genético con nueve marcadores moleculares SCAR.

Table 1. Origin, population, specie and number of accessions of *Phaseolus* sp., used in genetic analysis with nine SCAR molecular markers.

Estado	Población	Especie	Nº accesiones	
Veracruz	Acultzingo	<i>Phaseolus coccineus</i>	20	
	Altotonga	“	15	
	Jalapa	“	29	
	Ciudad Mendoza	“	6	
	Jalacingo	“	3	
	Perote	“	5	
	Veracruz	“	29	
	Veracruz Pv	<i>Phaseolus vulgaris</i>	7	
	Subtotal		114	
Puebla	Carso Huasteco	<i>Phaseolus coccineus</i>	3	
	Mercado Serdán	“	3	
	Mercado Zacapoaxtla	“	6	
	Nauzontla	“	3	
	Banco Germoplasma	<i>Phaseolus coccineus</i> (Silvestre)	15	
	Tlatlauquitepec	<i>Phaseolus coccineus</i>	5	
	Zacapoaxtla	“	10	
	Puebla Comerciales	<i>Phaseolus vulgaris</i> (BAT477, UI114 y <i>Phaseolus</i> Villa), <i>Phaseolus glabellus</i> , <i>Phaseolus lunatus</i>	5	
		Subtotal		50
		Total		164

Cuadro 2. Secuencias de iniciadores SCAR usados en *Phaseolus* sp. para identificar los genes que confieren resistencia a Tizón común, Virus del mosaico común del frijol, Virus del mosaico dorado y Mancha angular del frijol.

Table 2. Sequences of SCAR primers used in *Phaseolus* sp. to identify genes that confer resistance to Common Bacterial Blight, Bean Common Mosaic Virus, Golden Mosaic Virus and Angular Leaf Spot.

SCAR	Secuencia	Patógeno
SAP 6	F - GTC ACG TCT CCT TAA TAG TA R - GTC ACG TCT CAA TAG GCA AA	Tizón común
BAC6	F - TAG GCG GCG GCG CAC GTT TTG R - TAG GCG GCG GAA GTG GCG GTG	Tizón común
SU91	F - CCA CAT CGG TTA ACA TGA GT R - CCA CAT CGG TGT CAA CGT GA	Tizón común
LG5	F - GCA GGG TTC GAA GAC ACA CTG G R - GCA GGG TTC GCC CAA TAA CG	Tizón común
ROC11	F - CCA ATT CTC TTT CAC TTG TAA CC R - GCA TGT TCC AGC AAA CC	Virus del mosaico común del frijol
SBD5	F - GTG CGG AGA GGC CAT CCA TTG GTG R - GTG CGG AGA GTT TCA GTG TTG ACA	Virus del mosaico común del frijol
SR2	F - CAC AGC TGC CCT AAC AAA AT R - CAC AGC TGC CAC AGG TGG GA	Virus del mosaico dorado
SW12	F - TGG GCA GAA GTT CTA GCA TGT GGC R - TGG GCA GAA GCA CAG TAT GAT TTG	Virus del mosaico dorado
SN02	F - ACC AGG GGC ATT ATG AAC AG R - ACC AGG GGC AAC ATA CTA TG	Mancha angular

Cuadro 3. Programa de PCR para la amplificación de los marcadores moleculares SCAR.

Table 3. PCR amplification program for SCAR molecular markers.

Condición	Temperatura	Tiempo	Ciclos	SCAR
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min		Todos
Desnaturalización	94 °C	10 seg		SAP6,SU91, ROC11, SBD5, SR2
	92 °C	30 seg		BAC6
	94 °C	30 seg		LG5
	94 °C	30 seg		SW12,SNO2
Alineamiento	70 °C	30 seg		BAC6, SW12
	55 °C	40 seg		SAP6, ROC11
	60 °C	40 seg	34*	SR2
	56 °C	40 seg		SU91
	50 °C	30 seg		LG5
	65 °C	40 seg		SBD5
Extensión	65 °C	60 seg		SNO2
	72 °C	2 min		SAP6,SU91,ROC11, SBD5, SR2
	72 °C	1 min		BAC6, LG5, SW12
Extensión	72 °C	90 seg		SNO2
	72 °C	5 min	1	Todos

* Número de ciclos para desnaturalización, alineamiento y extensión

Cuadro 4. Frecuencias de amplificación de bandas SCAR en frijol (*Phaseolus* sp.).Table 4. SCAR amplification frequencies bands in bean (*Phaseolus* sp.).

Población	TC				BCMV		BGMV		MA	Promedio
	SAP6	BAC6	SU91	LG5	ROC11	SBD5	SR2	SW12	SN02	
Acultzingo	11	14	5	1	20	7	20	20	20	13,11
Altotonga	12	12	11	1	15	11	14	15	15	11,77
Jalapa	16	25	13	6	28	19	29	27	28	21,20
Cd. Mendoza	3	1	3	0	6	3	6	6	6	3,78
Jalacingo	1	3	1	0	3	1	3	3	3	2,00
Perote	4	4	0	0	5	2	5	5	5	3,33
Veracruz	17	10	2	0	24	11	25	20	22	14,56
Veracruz Pv	6	5	0	4	7	2	7	7	1	4,33
Promedio Veracruz.	5,97				10,25		13,25		12,50	
Carso Huasteco	2	1	0	0	1	1	2	1	2	1,11
M. Serdán	1	1	0	0	2	1	2	2	2	1,22
M. Zacapoaxtla	2	3	0	0	6	4	5	5	5	3,33
Banco germoplasma	2	1	0	0	3	3	3	3	3	2,00
Nauzontla	9	2	0	1	13	11	14	9	11	7,78
Tlatlauquitepec	4	2	0	0	5	5	5	4	4	3,22
Zacapoaxtla	6	8	0	1	8	8	9	7	8	6,11
P. Comerciales	3	3	2	2	1	4	4	2	1	2,44
Promedio Puebla	1,75				4,75		4,82		4,5	

TC= Tizón Común (Bacterial common blight); VMC= Virus del Mosaico Común del Frijol (Bean Common Mosaic Virus); BGMV= Virus del mosaico dorado (Bean Golden Mosaic Virus); MA= Mancha angular (Angular Leaf Spot); Promedio Veracruz= Promedio de frecuencias de bandas encontradas en las poblaciones de Veracruz; Promedio Puebla= Promedio de frecuencias de bandas encontradas en las poblaciones de Puebla; M = Mercado; Cd = Ciudad.

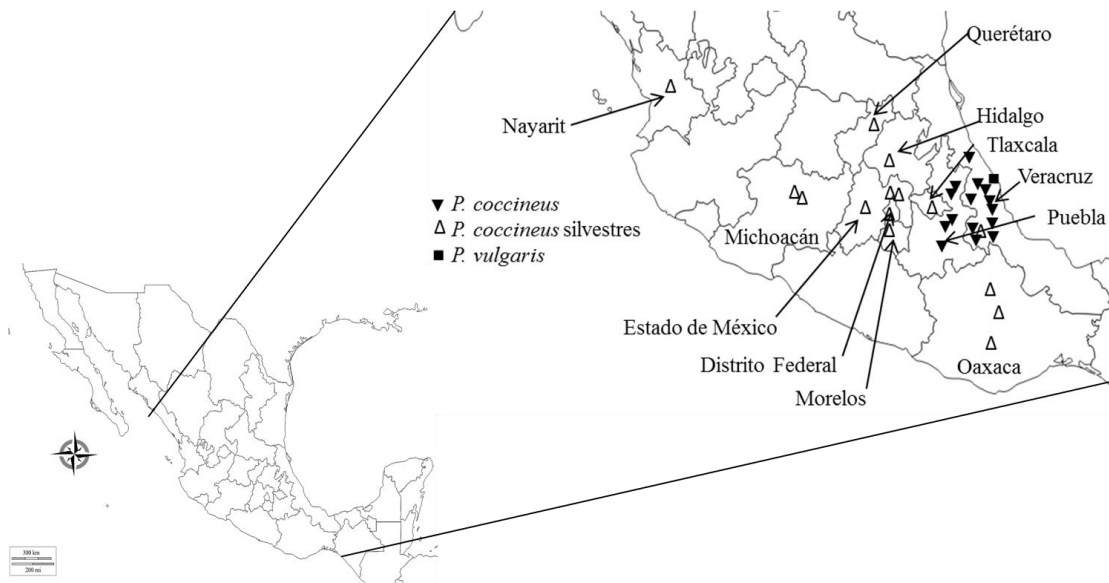


Figura 1. Distribución geográfica de los sitios de colecta de las accesiones silvestres y cultivadas de *Phaseolus* spp de Puebla y Veracruz.

Figure 1. Geographical distribution of collection sites of wild and cultivated accessions of *Phaseolus* spp from Puebla and Veracruz.

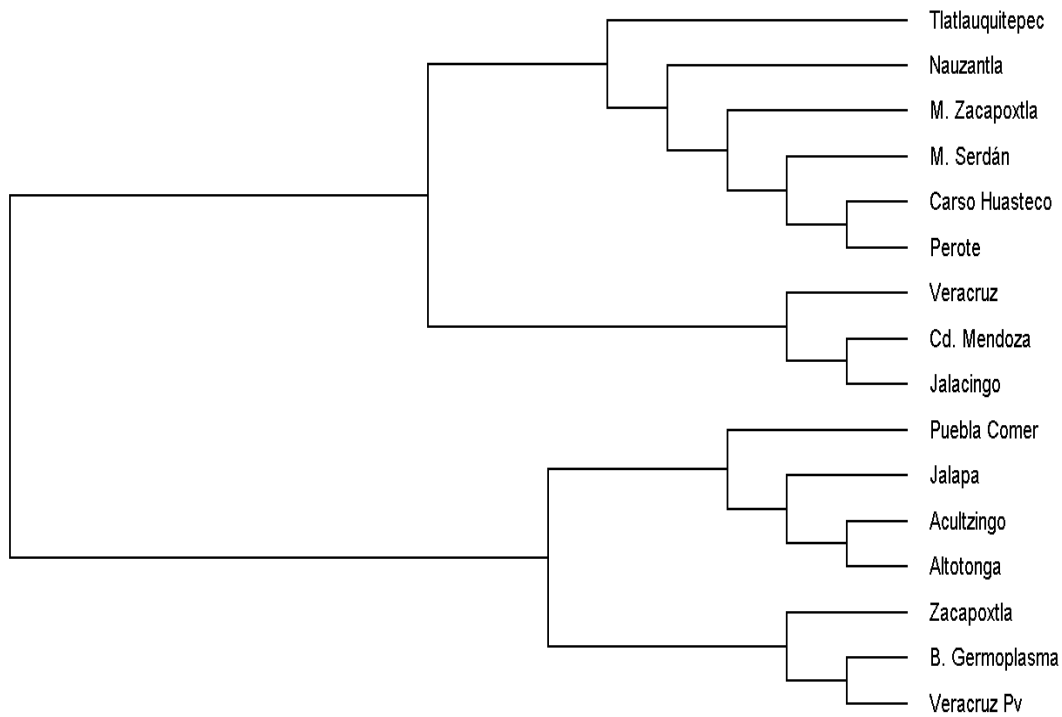


Figura 2. Dendrograma de 16 poblaciones de frijol de los estados de Veracruz y Puebla. México basado en marcadores SCAR.

Figure 2. Distance dendrogram of 16 bean populations of the states of Puebla and Veracruz, México based on markers SCAR.

VIII. DISCUSIÓN GENERAL

En este trabajo se consignan los resultados derivados de la colecta, conservación, análisis genético y aprovechamiento de germoplasma Mexicano de *Phaseolus coccineus* (frijol ayocote), un recurso genético subvalorado en la producción de frijoles en nuestro país, pero que si es valorado por sus características en la cocina de varios países particularmente de Europa. Además de su reconocimiento en el extranjero, la investigación presente y futura en *P. coccineus* deberá enfocarse en el mejoramiento de su conocimiento en términos genéticos, genómicos y biológicos en general, su conservación y uso, particularmente en el mejoramiento directo de la especie o bien, en su uso como aportante de genes útiles para el mejoramiento del frijol común (*P. vulgaris*), la especie más ampliamente cultivada del género *Phaseolus* a nivel mundial.

Los frijoles ayocotes se distinguen por crecer mejor en altitudes superiores a los 1400 msnm con temperaturas templadas y altos niveles de precipitación. El peso y las dimensiones de la semilla es en general mayor a la del frijol, un distintivo particular de la especie es la presencia de flores escarlatas o blancas y en ocasiones se encuentran ambos colores en una misma planta. Otra característica distintiva de los ayocotes es la ocurrencia de polinización cruzada con porcentajes que oscilan entre el 0 y 14%. Parte central de las estrategias de conservación se basan en el estudio de la estructura genética y las relaciones genéticas entre y dentro de accesiones de modo que se puedan identificar patrones de diversificación y valores de diversidad genética en regiones y germoplasma específico.

En el plano internacional, es recurrente el estudio de *P. coccineus* particularmente donde se incluye germoplasma ‘Europeo’, esto es, material genético obviamente originario de América que fue introducido siglos atrás a través de algunos países y de ahí se dispersó a todo el Continente. Los trabajos analizados en esta tesis coinciden en la clara diferenciación genética, con base en la utilización de variadas estrategias de marcadores moleculares (AFLPs, RAPDs, SSRs, cpSSRs, etc.) entre especies de *Phaseolus* en estudios con germoplasma de Polonia, Italia y España,

principalmente. Además, se ha detectado la esperada reducción de la diversidad genética del germoplasma de frijol ayocote introducido a Europa en comparación con germoplasma Americano. Un esfuerzo adicional se tradujo en la propuesta de una colección ‘mundial’ de ayocotes que, básicamente, incluye germoplasma ‘Europeo’ (60%) y que, por obvias razones, no es representativa de la diversidad genética global de la especie. Recientes estudios indican la diferenciación genética entre poblaciones y su consiguiente estructuración, producto de la polinización abierta entre y dentro de poblaciones, el intercambio de germoplasma y la selección empírica que, incluso, han llevado a proponer a Europa como un centro secundario de diversificación de *P. coccineus*.

Los esfuerzos Mexicanos han sido igualmente productivos. En principio se ha puesto especial interés en la colecta de germoplasma, por lo que se ha constituido una colección nacional con cerca de 800 accesiones principalmente originarias de las regiones comprendidas en el denominado Eje Neo-volcánico Transversal y la Sierra Madre Oriental (alrededor del 80% del germoplasma). Dicho germoplasma Mexicano de frijol ayocote claramente proviene de sitios templados (temperaturas medias mínimas entre 2 y 5 °C) o bien de sitios o regiones fríos, con temperaturas medias mínimas de 0 a -2 ° C. El germoplasma de regiones frías es más precoz, produce semillas pequeñas y vainas cortas.

Este trabajo de tesis es un esfuerzo inicial de análisis y estudio de la diversidad genética así como de las relaciones genéticas de germoplasma de frijol ayocote originario de regiones productoras importantes de esta leguminosa. También, el estudio se encamina a la búsqueda de germoplasma con alta frecuencia de genes de resistencia a las enfermedades más comunes que aquejan a *Phaseolus* en el centro y el trópico de México, con la premisa básica de detectar aquellos genotipos que tengan potencial para ser incorporados en el mejoramiento genético de *P. vulgaris* en México o bien, ser seleccionados directamente en el incipiente proceso de mejoramiento genético de *P. coccineus*.

El primer estudio permitió obtener resultados importantes. En principio, el ratificar la presencia de diversidad genética significativa entre y dentro de poblaciones de frijol ayocote de México; constatar que, en esencia, las estrategias de marcadores moleculares de tipo dominante o co-dominante ofrecen resultados estadísticamente confiables que permiten identificar grupos genéticos con valores similares de coancestría y evidencias de la estructuración genética de las poblaciones, particularmente con base en su especie, su estatus genético, y, finalmente su origen agro-ecológico.

Cada estrategia presentó sus ventajas y desventajas al momento de aplicarse en *P. coccineus*, principalmente con argumentos como el número de productos amplificados, detección de heterocigosidad y de polimorfismos, así como el poder discriminante. La conclusión importante reside en que debemos tener en consideración la utilidad de cualquier estrategia de análisis de genotipos con base en el balance entre el grado de polimorfismos detectados y la magnitud a la cual un ensayo puede identificar polimorfismos múltiples. Aunque hubo diferencias en las topologías producidas en el agrupamiento del germoplasma analizado, las dos estrategias de marcadores moleculares claramente diferenciaron entre especies de *Phaseolus*; germoplasma silvestre, criollo o mejorado y, también, entre germoplasma de Puebla o Veracruz. La aparente baja concordancia entre estrategias en cuanto a los agrupamientos de genotipos con base en origen se fundamenta en las fracciones del genoma que cada una de aquéllas ‘ataca’ y amplifica durante el análisis, dado que estamos hablando de fracciones que varían en sus números de repeticiones en el genoma o bien, el caso de secuencias únicas que muestran tasas de evolución diferentes a través de la selección natural o artificial (humana). Un dato interesante adicional fue el identificar que el germoplasma criollo y silvestre de *P. coccineus* aún crece *in situ* en nuestro país y por tanto representa poblaciones vegetales casi únicas dado su rango de adaptación específico derivado de la dinámica evolutiva siempre bajo cambio continuo y la consiguiente ‘captura’ de nuevos genes producto de la hibridación.

El estudio del frijol ayocote en México y otros países muestra discrepancias importantes particularmente en el enfoque. En nuestro país son recurrentes los estudios basados en marcadores morfológicos y el comportamiento agronómico en campo;

mientras que en otros países particularmente Europeos se enfatiza el análisis molecular en cuestiones de filogenia, estructura genética de poblaciones y estimaciones de variabilidad genética. A partir de 2010, los estudios de Ruiz-Salazar utilizaron marcadores moleculares AFLP en el estudio de germoplasma silvestre y cultivados de *P. coccineus* de México. Un dato recurrente en estudios de genética de poblaciones en frijol ayocote es la detección de valores significativos de varianza genética dentro de las poblaciones, incluso mayores a las exhibidas por poblaciones silvestres de *P. vulgaris*. Esto es un claro indicador de la naturaleza de la polinización abierta de la especie, lo que aunado con el intercambio de semillas entre agricultores y regiones agrícolas, redundan en la formación de poblaciones dentro de accesiones, o más bien genotipos característicos y diferentes dentro de una misma accesión. Esto abre un nicho de oportunidades en cuanto a la búsqueda de material promisorio o la identificación de germoplasma a mejorar, en virtud de que se estará partiendo de poblaciones altamente variables que posibilitarán un mejoramiento genético efectivo y eficiente. También, que debemos ser muy cuidadosos en las estrategias de muestreo y colecta, de conservación y de análisis en campo o condiciones controladas para no sub-estimar la naturaleza real de la variabilidad genética de cada accesión o población y entonces, diseñar una estrategia de multiplicación y renovación del germoplasma que maximice la preservación íntegra de la variabilidad genética de cada población.

Otra diferencia reside entre las colecciones ‘núcleo’ que se han diseñado para el estudio de la diversidad genética en *P. coccineus*. Mientras en México no se diseña esa colección y se parte de la colección base nacional con alrededor de 800 genotipos, en Europa se propuso en 2011 una colección ‘mundial’ con 228 accesiones y de ellas, sólo 23% proviene de Mesoamérica, la región de donde se originó la especie; mientras que el 65% se origina de Europa, esto es germoplasma primero introducido de América a dicho continente y de ahí, dispersado a diversas regiones y manipulado genéticamente por agricultores en cada región productora de acuerdo con los intereses particulares y las condiciones agroecológicas predominantes. Así, dicha colección no representa correctamente la diversidad global de la especie, sino que sobre-representa la diversidad del germoplasma ‘Europeo’. Consideramos que un avance significativo se basará en la estructuración y propuesta formal de una ‘colección núcleo’ de la especie que pondere la

representación del germoplasma con base en las regiones que mayor variabilidad genética ofrecen de *P. coccineus*.

El segundo trabajo experimental evidenció la presencia de mayor frecuencia de genotipos de frijol ayocote con mayor número de genes de resistencia a enfermedades fungosas, virales y bacterianas provenientes del estado de Veracruz, en comparación con germoplasma de Puebla y otras regiones y/o estatus genético. La incorporación de resistencia genética simple y/o múltiple a las enfermedades de importancia económica en cada región agroecológica donde se produce frijol se basa en la búsqueda constante de nuevas fuentes de resistencia y su posterior incorporación a los programas de cruzamiento, evaluación y selección de germoplasma segregante en condiciones de campo y/o controladas. Todo ello con el objetivo fundamental de obtener germoplasma con resistencia a dicho factor adverso, rendimientos altos y estables y, si es posible, con características de calidad del grano superiores. Mientras que en países como Estados Unidos la SAMM se usa recurrentemente en frijol común para incorporar genes y acelerar la obtención de germoplasma con resistencia genética, en México recién comienza, pues a la fecha sólo una variedad liberada bajo dicho esquema se ha producido con resistencia al virus del mosaico común del frijol y al virus de la raíz negra o necrosis.

En general, las mayores frecuencias de SCARs de resistencia a tizón común, virus del mosaico común del frijol y mancha angular se observaron en germoplasma de Veracruz. Diversos trabajos han enfatizado mayores incidencias y daños por las tres enfermedades en frijol cultivado en Veracruz en comparación con Puebla. Las mayores presiones de selección por las condiciones ambientales favorables para la mayor incidencia de enfermedades y de inóculo primario y mayor patogenicidad en los aislamientos de Veracruz posiblemente han llevado a los agricultores de dicho estado a seleccionar empíricamente por mayor resistencia a enfermedades y, por consiguiente, el incremento de la frecuencia de genes de resistencia en las mismas

El mejoramiento genético tradicional se fundamenta en la identificación, selección fenotípica e introgresión de los caracteres deseados para el desarrollo de

germoplasma superior. Esto se ha hecho recurrentemente por ejemplo para mejorar los rasgos agronómicos importantes como rendimiento de grano, fenología o calidad del grano, así como para la obtención de resistencia a diversos factores adversos abióticos y bióticos. Este proceso dura usualmente entre 5 y 8 años o, incluso, más. Los tiempos y los costos podrán reducirse al utilizar SAMM en frijol. La esencia de la SAMM hasta la actualidad se basa en la conversión de un marcador molecular que co-segrega con los genes de resistencia de interés o bien, son los genes de interés y que luego se convierten en SCARs. Sin embargo la eficiencia de un SCAR se puede reducir si dicho marcador es dominante, por la presencia de ligamiento en fase de repulsión entre los marcadores y los rasgos dominantes, la necesidad de llevar a cabo pruebas de progenie o a los cambios en la especificidad de los marcadores a grupos de ligamiento, tipos comerciales de grano y/o acervos genéticos.

Los resultados de este trabajo alientan la continuación del mismo, en el sentido del manejo genético correspondiente que apoye el uso de las posibles fuentes de resistencia en el mejoramiento genético de *Phaseolus*, particularmente para las regiones tropicales y sub-tropicales de México. A la par de ello, es indispensable saber que el desarrollo de estrategias de marcadores moleculares sigue y cada nueva opción debe evaluarse y probarse, tal es el caso de la secuenciación de nueva generación que aprovecha polimorfismos derivados de secuencias simples repetidas, inserciones-delecciones (InDels) o polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) con la base de secuencias genómicas de referencia recién liberadas para asignar las posiciones genómicas físicas e identificar genes candidatos. Otra estrategia se fundamenta en combinar el análisis de segregantes en grupos y el de perfiles transcripcionales de datos RNA-secuenciación en el mapeo de QTLs y de mutantes. Lo anterior ha obligado a generar plataformas de alto rendimiento para el análisis genómico integral (BeanCAP, Langebio). Finalmente, las estrategias antes descritas deberán realizar el análisis de segregantes en grupo ‘*in silico*’ para poder detectar variaciones de SNPs entre individuos con fenotipo y genotipo definido en regiones genómicas específicas. Así se podría sortear la necesidad de desarrollar poblaciones de mapeo o analizar genéticamente la población original en la que el gen o el QTL se identificó.

Los análisis AFLP y SSR empleados en el presente estudio de ayocote nos aportan una visión general del estado actual de la diversidad genética almacenada en el banco de germoplasma y nos da una idea de que tan útil puede ser en programas de mejoramiento genético con el objetivo de producir nuevas líneas mejoradas de frijol destinadas al consumo humano. Las poblaciones estudiadas, principalmente las de Veracruz que presentaron las mayores frecuencias de SCARs, podrán utilizarse en programas de mejoramiento genético de la resistencia a las enfermedades que más afectan al cultivo del frijol en México.

IX. CONCLUSIONES

Pocos son los estudios de evolución y diversidad genética realizados en ayocote dichos estudios son importantes por muchas razones una de ellas es la obtención de conocimiento sobre la diversidad genética presente en especies silvestres afines a las cultivadas lo cual nos permite obtener el punto de partida en programas de mejoramiento de frijol ya que al explorar nuevos materiales en los que su diversidad genética no esta incluida en las especies cultivadas pueden emplearse en el desarrollo de nuevas líneas de frijol mejoradas. Nuestros resultados indican alta diferenciación genética entre y dentro de las accesiones de frijol ayocote del estado de Veracruz. También, los datos sugieren una importante fuente de alelos útil para ser incluida en programas de mejoramiento ya sea en *P. coccineus* o *P. vulgaris*.

Los SCAR empleados en el presente estudio fueron efectivos para amplificar la secuencia ligada al gen de resistencia a las enfermedades que identifican cada uno de ellos. En consecuencia se demuestra que las poblaciones evaluadas de *P. coccineus* son reservorio de genes valiosos de resistencia a las cuatro enfermedades que identifican los SCAR usados en esta investigación, también, quedo de manifiesto que las poblaciones de Veracruz poseen en promedio ocho SCAR más que las de Puebla, principalmente para resistencia al Virus del mosaico dorado (BGMV) y la Mancha angular (MA) por lo que el germoplasma evaluado puede ser usado en programas de mejoramiento genético, para incorporar resistencia genética en genotipos de interés y nuevas variedades .

X. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

Finalmente, sugerimos que la diversidad genética es el principal desafío para el botánico y el taxónomo así también para las instituciones gubernamentales de México en orden de mantener las poblaciones naturales tanto *in situ* como *ex situ* con fines de preservación, por lo que se recomienda continuar con los trabajos de colecta y preservación de germoplasma con características deseables en el mejoramiento de *Phaseolus* con el firme objetivo hacer frente al reto que implica el suministro de alimentos para la población humana que consume este grano.

XI. LITERATURA CITADA

- Acampora, A., M. Ciaffi, C. De Pace, A.R. Paolacci, and O.A. Tanzarella. 2007. Pattern of variation for seed size traits and molecular markers in Italian germplasm of *Phaseolus coccineus* L. *Euphyt.* 157:69-82.
- Acosta-Gallegos, J. A., J. D. Kelly & P. Gepts. 2007. Prebreeding in common bean and use of genetic diversity from wild germplasm. *Crop Sci.* 47(3): 44-59.
- Acosta, G.J.A., M.J.S. Muruaga, y R.F. Cárdenas. 1991. Utilización y disponibilidad de recursos genéticos de *Phaseolus* en México. *In:* R. Ortega P., G. Palomino H., F. Castillo G., V. González H. y M. Livera M. (eds.). *Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos de México.* SOMEFI. Chapingo, México. pp. 187-196.
- Alvarez, M.T., L.E. Sáenz de Miera, and M. Pérez de la Vega. 1998. Genetic variation in common and runner bean of the Northern Meseta in Spain. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 45:243-251.
- Ayala-Garay, O.J., J.M. Pichardo-González, J.A. Estrada-Gómez, J.A. Carrillo-Salazar, y A. Hernández-Livera. 2006. Rendimiento y calidad de semilla de frijol ayocote en el Valle de México. *Agric. Téc. Méx.* 32:313-321.
- Barrios, M.R.P. 2011. Identificación de QTLs asociados a características agronómicas de interés, en una retrocruza avanzada de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de Bióloga. Universidad del Tolima, Facultad de Ciencias, Programa de Biología, Ibagué-Tolima, 128 p.
- Basurto-Peña, F.A. 2000. Aspectos etnobotánicos de *Phaseolus coccineus* L. y

- Phaseolus polyanthus* Greenman en la sierra norte de Puebla, México. Tesis Maestría en Ciencias en Biología. UNAM. México. pp: 96.
- Baudoin, J.P., F. Camarena, and M. Lobo. 1997. Improving *Phaseolus* genotypes for multiple cropping systems. *Euphytica* 96:115–123.
- Beebe, S., P.W. Sckroch, J. Tohme, M.C. Duque, F. Pedraza, and J. Nienhuis. 2000. Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop Sci.* 40:264-273.
- Begoña-Olmedilla, A., R. Farré-Rovira, C. Asensio-Vegas y M. Martín-Pedrosa. 2010. Papel de las leguminosas en la alimentación actual. *Activ. Diét.* 14(2):72-76.
- Boczkowska, M., Z. Bulinska-Radomska and J. Nowosielski. 2012. AFLP analysis of genetic diversity in five accesions of Polish runner bean (*Phaseolus coccineus* L.) *Genet Resour Crop Evol.* 59:473-478.
- Broughton, W.J., G. Hernández, M. Blair, S. Beebe, P. Gepts, and J. Vanderleyden. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) model food legumes. *Plant and Soil* 252: 55–128.
- Castro, A., J. C. Rosas, L. Aranda. 2001. Aplicación de los marcadores moleculares para la caracterización de la biodiversidad y el mejoramiento genético de plantas. (intranet). Zamorano, HN. Zamorano. Disponible en [http://clases/bin/frame.pl/?/](http://clases/bin/frame.pl?/) Consultado 18 de Diciembre de 2014.
- Catarcione, G., A.R. Paolacci, O.A. Tanzarella, F. Mercati, F. Sunseri, S. Capano, L. Margaritelli, A. Fopoli, & M. Ciaffi. 2013. Genetic diversity and population structure of ‘Fagiolone’ (*Phaseolus coccineus* L.), a landrace cultivated in the

- regional natural park of Simbruini mountains. Procc. 57th Italian Soc. Agric. Gen. Ann. Congr. Poster comm abstr.
- Debouck, D.G. 1991. Systematics and morphology. En: A. van Schoonhoven and O. Voyset (ed.) Common beans: Research for crop improvement. C.A.B. Intl., Wallingford, UK and CIAT, Cali, Colombia, pp. 55-118.
- Delgado-Salinas, A., R. Bibler, and M. Lavin. 2006. Phylogeny of the Genus *Phaseolus* (Leguminosae): A Recent Diversification in an Ancient Landscape. Syst. Bot. 3:779-791.
- Duncan, R.W., H. Terán, S.P. Singh, and R.L. Gilbertson. 2006. Comparison of marker-assisted and direct selection for introgression of common bacterial blight resistance in common bean. Bean Improv. Coop. 49:11-12.
- Escalante-Estrada, J.A., M.T. Rodríguez-González, and M. Gutiérrez-Rodríguez. 2005. Growth analysis of *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus coccineus* L. in a saline soil. Bean Improv. Coop. 48:26-27.
- Fourie, D., L. Herselman & C. Mienie. 2011. Improvement of common bacterial blight resistance in southafrican dry bean cultivar teebus. Afr. Crop Sci. J. 19(4): 377-386.
- Freytag, G.F., and D.G. Debouck. 2002. Taxonomy distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionoideae) in North America, México and Central America. Bot. Res. Instit. of Texas. Sida. Bot. Miscellany 23.

- García, S.A. 2014. Insuficiente en México la producción de frijol. Disponible en: <http://www.eldiariodecoahuila.com.mx/notas/2013/10/30/insuficiente-mexico-produccion-frijol-395641.asp> Fecha de consulta 14/12/2014.
- Garrido-Ramírez, E.R., M.R. Sudarshana & R.L. Gilbertson. 2000. Bean golden yellow mosaic virus from Chiapas, Mexico: Characterization, Pseudorecombination with Other Bean-Infecting Geminiviruses and Germ Plasm Screening. *Phytopathol.* 90(11): 1224-1232.
- Gepts, P., F.J.L Aragão, E. Barros, M.W. Blair, R. Brondani, W. Broughton, I. Galasso, G. Hernández, J. Kami, P. Lariguet, P. McClean, M. Melotto, P. Miklas, P. Pauls, A. Pedrosa, T. Porch, F. Sánchez, F. Sparvoli, and K. Yu. 2008. Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. Moore, P.H. and R. Ming (eds.), *Genom. Trop. Crop Plants* 5:113-143.
- Gilmore, B., and J.R. Myers. 2004. A preliminary molecular marker map for *Phaseolus coccineus*. *Bean Improv. Coop.* 47:87-88.
- Giurcă, D.M. 2009. Morphological and phenological differences between the two species of the *Phaseolus* genus (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*). *Cerc. Agronom. în Mold.* 42(2): 39-45.
- González-Martínez, N.A., F.H. Ferwerda, M. Alameda, J.C. Rosas, and J.S. Beaver. 2005. Identification of new sources of resistance to web blight of common bean. *Bean Improv. Coop.* 48:130-131.

- González, A., A. Wong, A. Delgado-Salinas, R. Papa, and P. Gepts. 2005. Assessment of inter simple sequence repeat markers to differentiate sympatric wild and domesticated populations of common bean. *Crop Sci.* 45:606-615.
- Gutiérrez-Rodríguez, M., and J.A. Escalante-Estrada. 2005. Association between stomatal conductance and yield in *Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*. *Bean Improv. Coop.* 48:150-151.
- Guzmán-Maldonado, S. H., R. Reynoso-Camacho, I. Torres-Pacheco, and J.A. Acosta Gallegos. 2007. Frijol contra el Cáncer. Campo Experimental Bajío, INIFAP. Celaya, Gto. Disponible en: <http://www.fabricaweb.info/teorema/?p=499> [Fecha de consulta: 29 de septiembre de 2009].
- Hernández-Xolocotzi, E., A. Ramos, and A.M.A Martínez. 1979. Etnobotánica *In*: E. Mark Engleman (ed.). Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. pp: 321-333.
- IFT. 2014. México: cosecha de frijoles primavera-verano 2014. International Food Trader Disponible en: <https://www.goift.com/translations/141006-espanol-mexico-cosecha-de-frijoles-primavera-verano-2014-kutnowski/> Fecha de consulta 14/12/2014.
- International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). 2000. Bancos de Germoplasma. Disponible en: www.ipgri.cgiar.org/training/exsitu/web/m_ppal_b_bancos_germo_plasma.htm. [Fecha de consulta: 1 de junio de 2008].
- Kaplan, L. 1980. What is the origin of the common bean? *Econ. Bot.* 19:358-368.

- Kelly, J.D., P. Gepts, P.N. Miklas, D.P. Coyne. 2003. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crops Res.* 82: 135-154.
- Llaca, V., A.D. Salinas, and P. Gepts. 1994. Chloroplast DNA as an evolutionary marker in the *Phaseolus vulgaris* complex. *Theor. Appl. Genet.* 88:646-652.
- Mahuku, G., C. Montoya, M.A. Henríquez, C. Jara, H. Teran & S. Beebe. 2004. Inheritance and characterization of angular leaf spot resistance gene present in common bean accession G 10474 and identification of an AFLP marker linked to the resistance gene. *Crop Sci.* 44: 817-824.
- Márquez, M.L., H. Terán, and S.P. Singh. 2007. Selecting common bean with genes of different evolutionary origins for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Crop Sci.* 47:1367-1374.
- Martínez, T., M. Santalla, and A.M. De Ron. 2002. Preliminary evaluation of scarlet runner bean landraces from Spain. *Bean Improv. Coop.* 45:60-61.
- Mercado-Ruaro, P. 1998. Hibridación Genómica (GISH y DOT blots) en el complejo *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus* (Fabaceae - Phaseoleae). Tesis de Maestría en Ciencias en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM México D. F. pp: 12-14.
- Mercati, F., G. Catarcione, A.R. Paolacci, M.R. Abenavoli, F. Sunseri, & M. Ciaffi. 2015. Genetic diversity and population structure of an Italian landrace of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.): inferences for its safeguard and on-farm conservation. *Genetica.* 1-13 DOI 10.1007/s10709-015-9846-1.

- Mienie, C.M.S., M.M. Liebenberg, Z.A. Pretorius & P.N. Miklas. 2005. SCAR markers linked to the common bean rust resistance gene Ur-13. *Theor. Appl. Genet.* 111: 972-979.
- Miranda-Colín, S. 1990. Identificación de las especies cultivadas del género *Phaseolus*. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. pp:10-11.
- Muñoz-Saldaña, R. 2010. Frijol, rica fuente de proteínas. *Biodiversitas.* 89:7-11.
- Muruaga, M.J.S. 1996. Descripción varietal del frijol ayocote “Blanco Tlaxcala”. Desplegable para Productores. SAGAR-INIFAP-Fundación Produce Tlaxcala. Chapingo, México. 2 p.
- Muruaga, M.J.S., F. Cárdenas, y J. A. Acosta Gallegos. 1992. Hibridación natural y métodos de polinización manual en *Phaseolus coccineus* L. *In: Memoria de la XXXVIII Reunión Anual Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios y Animales.* Managua, Nicaragua, pp. 307-311.
- Navarro-Garza, H., M.A. Pérez-Olvera, y F. Castillo-González. 2007. Evaluación de cinco especies vegetales como cultivos de cobertura en Valles Altos de México. *Rev. Fitotec. Mex.* 30:151-157.
- Negri, V., and N. Tosti, 2002: *Phaseolus* genetic diversity maintained on-farm in central Italy. *Genet. Res. Crop Evol.* 49, 511—520.
- Ngai, P.H.K., and T.B. Ng. 2004. Coccinin, an antifungal peptide with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from large scarlet runner beans. *Peptides.* 25:2063-2068

- Nowosielski, J., W. Podyma, & D. Nowosielska. 2002. Molecular research on the genetic diversity of Polish varieties and landraces of *Phaseolus coccineus* L. and *Phaseolus vulgaris* L. using the RAPD and AFLP methods. Cell. Mol. Biol. Let. 7(2002): 753-762.
- Pérez-Herrera, P., G. Esquivel-Esquivel, R. Rosales-Serna, y J.A. Acosta-Gallegos. 2002. Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México. Arch. Lat. Nutr. 52:172-180.
- Pinchi-Ramírez, M.H. 1999. Formación de poblaciones complejas superiores de cruces interespecíficos del género *Phaseolus* y su comportamiento para las zonas altoandinas del Perú. Tesis de Maestría. Universidad Agraria La Molina. Lima, Perú. pp 28.
- Porch, T.G., J.S. Beaver, D.G. Debouck, S.A. Jackson, J.D. Kelly & H. Dempewolf. 2013. Use of Wild Relatives and Closely Related Species to Adapt Common Bean to Climate Change. Agron. 3: 433-461
- Ramírez-Vallejo, P., M. Castillo-Mendoza, F. Castillo-González, y S. Miranda-Colín. 2006. Diversidad morfológica de poblaciones nativas de frijol común y frijol ayocote del oriente del Estado de México. Rev. Fitotec. Mex. 29:111-119.
- Reynoso-Camacho, R., M.C. Ríos-Ugalde, I. Torres-Pacheco, J.A. Acosta-Gallegos, A.C. Palomino-Salinas, M. Ramos-Gómez, E. González-Jasso, y S.H. Guzmán-Maldonado. 2007. El consumo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su efecto sobre el cáncer de colon en ratas Sprague-Dawley. Agric. Téc. Méx. 33:43-52.

- Rodiño, A.P., M. Lema, B.M. Pérez, M. Santalla, and A.M. De Ron. 2006. Assessment of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.) germplasm for tolerance to low temperature during early seedling growth. *Euphytica* 155:63-70.
- Rodriguez, M., D. Rau, S.A. Angioi, E. Bellucci, E. Bitocchi, L. Nanni, H. Knüpfner, V. Negri, R. Papa, & G. Attene. 2013. European *Phaseolus coccineus* L. landraces: Population structure and adaptation, as revealed by cpSSRs and phenotypic analyses. *Plos One*. 8(2): 1-12.
- Rodríguez, M.O., B. Faure, Á.R. Benítez y S.E. Beebe. 2007. Identificación de genotipos resistentes al virus de mosaico dorado amarillo del frijol (BGYMV) mediante el uso del marcador molecular *bgm-1*. *Tem. de Cien. y Tec.* 11(33): 57-63.
- Rosas, J.C. 1998. El cultivo del frijol común en América Tropical. Zamorano, HN, Zamorano. Acad. Press. 52 p.
- Ruíz-Salazar R., V.M. Hernández-López, S. Hernández-Delgado, M.L.P. Vargas-Vázquez, J.S. Muruaga-Martínez, and N. Mayek-Pérez. 2010a. Detection of scar markers linked to resistance to common blight and anthracnose in ayocote beans. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 53: 212-214.
- Ruíz-Salazar R., S. Hernández-Delgado, M.L.P. Vargas-Vázquez, J.S. Muruaga-Martínez, and N. Mayek-Pérez. 2010b. Genetic diversity analysis of *Phaseolus coccineus* L. from Huasteco Karst of México. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 53: 182-184.
- Sangabriel, W., R. Ferrera-Cerrato, D. Trejo-Aguilar, M.R. Mendoza-López, J.S. Cruz-

- Sánchez, C. López-Ortiz, J. Delgadillo-Martínez, y A. Alarcón. 2007. Tolerancia y capacidad de remediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. *Rev. Inter. Cont. Amb.* 22:63-73.
- Santalla, M., A.B Monteagudo, A.M González, and A.M. De Ron. 2004b. Agronomical and quality traits of runner bean germplasm and implications for breeding. *Euphytica* 135:205-215.
- Santalla, M., M.C. Menéndez-Sevillano, A.B. Monteagudo, and A.M. De Ron. 2004a. Genetic diversity of Argentinean common bean and its evolution during domestication. *Euphytica* 135:75-87.
- Schwartz, H.F., K. Otto, H. Terán, and S.P. Singh. 2004. Inheritance of white mold resistance in the interspecific crosses of pinto cultivars Othello and UI 320 and *Phaseolus coccineus* L. Accessions PI 433246 and PI 439534. *Bean Improv. Coop.* 47:279-280.
- Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2015. Producción agrícola. Ciclo: cíclicos y perennes. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> [fecha de consulta 4 de junio de 2015].
- Sicard, D., L. Nanni, O. Porfiri, D. Bulfon, and R. Papa. 2005. Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. landraces in central Italy. *Plant Breed.* 124:464-472.

- Silue, S., Y. Muhovski, J.M. Jacquemin, and J.P. Baudoin. 2005. Different expression levels of lipid transfer protein gene during early stages of *Phaseolus coccineus* embryogenesis. *Bean Improv. Coop.* 48:32-33.
- Singh, S.P. 2001. Broadening the genetic base of common bean cultivars: A review. *Crop Sci.* 41:1659-1675.
- Souza, V., L. Eguiarte, G. Ávila, R. Cappello, C. Gallardo, J. Montoya, and D. Piñero. 1994. Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar *phaseoli* associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. *J. Amer. Soc. Microbiol.* 60:1260-1268.
- Spataro, G., B. Tiranti, P. Arcaleni, E. Bellucci, G. Attene, R. Papa, P. Spagnoletti-Zeuli, and V. Negri. 2011. Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theor. Appl. Genet.* 122:1281-1291.
- Terán, H., and S.P. Singh. 2005. Progress in introgressing white mold resistance from the secondary gene pool of dry bean. *Bean Improv. Coop.* 48:126-127.
- Towil, L.E., and E.E. Roos. 1989. Techniques for preserving of plant germplasm. *In*: Knutson L; Stoner AK. (eds.). *Biotic diversity and germplasm preservation: global imperatives.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp: 13-41.
- Treviño, Q.C. y R. Rosas. 2013. El frijol común: factores que merman su producción. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana.* Volumen XXVI Número 1. Disponible en:

<http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol26num1/articulos/el-frijol.html>

Fecha de consulta 13/12/2014.

- Vargas-Vázquez, M. L. P., J.S. Muruaga-Martínez, J.M. Hernández-Casillas, y J. Díaz-De la Cruz. 2007. Diagnóstico de la forma cultivada del frijol ayocote *Phaseolus coccineus* L. e información geográfica de los sitios de colecta Campo Experimental Valle de México, INIFAP. Chapingo, México pp. 2-18.
- Vargas-Vázquez, M. L. P., y M.B.G. Irizar-Garza. 2004. Efecto del brasinoesteroide y densidad de población en la acumulación de biomasa y rendimiento del ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) Rev. Chapingo Serie Horticultura 11:269-272.
- Vargas-Vázquez, M.L.P. 2001. El frijol ayocote grupo PRODUCE. 7:1-9.
- Vargas-Vázquez, M.L.P., J.S. Muruaga, R. Lépiz y A. Pérez. 2012. La colección INIFAP de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) I. Distribución geográfica de sitios de colecta. Rev. Mex. de Cien. Agríc. 3(1): 1247-1259.
- Vargas-Vázquez, M.L.P., J.S. Muruaga-Martínez, S.E. Martínez-Villarreal, R. Ruíz-Salazar, S. Hernández-Delgado y N. Mayek-Pérez. 2011. Diversidad morfológica del frijol ayocote del Carso Huasteco de México. Rev. Mex. de Biodiv. 82: 767-775.
- Vargas-Vázquez, M.L.P., J.S. Muruaga-Martínez, y A. Pérez-Guerrero. 2013. Temperatura y precipitación de los sitios de colecta de variedades nativas de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.). Rev. Mex. Cienc. Agric. 4(6): 843-853.
- Zavala-Olalde, J.A. 1998. Comparación del crecimiento y desarrollo de tres variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) y una variedad de frijol ayocote (*P.*

coccineus). Tesis de Licenciatura en Biología Facultad de Ciencias, UNAM,
México D. F. pp. 40-56.