

## DIVERSIDAD ISOENZIMÁTICA EN POBLACIONES NATIVAS DE FRIJOL NEGRO

## ISOZYMIC DIVERSITY IN BLACK DRY BEAN NATIVE POPULATIONS

Carlos H. Avendaño Arrazate<sup>1\*</sup>, Porfirio Ramírez Vallejo<sup>1</sup>, Fernando Castillo González<sup>1</sup>,  
José Luis Chávez Servia<sup>2</sup> y Gabriel Rincón Enríquez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa en Genética, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgrados. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. C.P. 56230. Montecillo, Edo. de México. Tel y Fax: 01 (595) 952-0262. Correo electrónico: a carlos@colpos.mx <sup>2</sup> Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados- Unidad –Mérida, Instituto Politécnico Nacional. Carr. Antigua a Progreso. Km.6. C.P. 97310. Mérida, Yucatán.

\* Autor responsable

## RESUMEN

La diversidad genética presente en poblaciones nativas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) tipo negro de México, se evaluó en una muestra de 50 de poblaciones de frijol común provenientes de diferentes regiones geográficas, con 20 sistemas isoenzimáticos. Los extractos isoenzimáticos fueron obtenidos por maceración de radículas de cinco plántulas. Seis isoenzimas mostraron polimorfismo: Ácido shikímico deshidrogenasa (SAD) con dos *loci*; Diaforasa (DIA) con cinco *loci*; Enzima mática (ME) con dos *loci*; Esterasa (EST) con dos *loci*; Fosfohexosa isomerasa (PHI) con tres *loci* y Malato deshidrogenasa (MDH) con dos *loci*. De 16 *loci* en total, 11 resultaron polimórficos con un porcentaje de polimorfismo de 68.7 %. El grado de polimorfismo por *locus* varió de uno a seis y en promedio fue de tres alelos por *locus*. El análisis de conglomerados, con base en las distancias genéticas de Nei y el método de ligamiento promedio (UPGMA), mostró que las poblaciones del trópico y zona centro de México mostraron la mayor diversidad genética. Se logró establecer un patrón de distribución con base en alelos específicos, y dentro de cada grupo se observó una distribución continua de la diversidad. La técnica usada mostró la amplitud de la distribución de la diversidad genética existente en poblaciones nativas de frijol tipo negro en México, así como su utilidad para la caracterización de la diversidad genética en esta especie.

**Palabras clave:** *Phaseolus vulgaris* L., diversidad genética, frijol negro, isoenzimas.

## SUMMARY

Genetic diversity in 50 landraces of black-bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from different geographic regions of México, was isozymically assessed on 20 different isozymes. Isozymic extracts were obtained by grinding radicles from five seedlings. Six isozymes showed polymorphism: Shikimic acid dehydrogenase (SAD) with two *loci*; Diaphorase (DIA) with five *loci*; Malic enzyme (ME) with two *loci*; Esterase (EST) with two *loci*; Phosphohexase isomerase (PHI) with three *loci*, and Malate dehydrogenase (MDH) with two *loci*. Eleven *loci* out of 16 were polymorphic (68.7 % of polymorphism). Polymorphism per *locus* was from one to six alleles, with a mean of three alleles per *locus*. Cluster analysis, based on Nei's genetic distances ac-

cording to the mean linkage method (UPGMA), showed the largest genetic diversity in populations from the central zone and from the tropics of México. A distribution pattern based on specific alleles was established; and within each group a continuous distribution of diversity was observed. Isozyme analysis was useful to show the amplitude in the distribution of the genetic diversity among black bean Mexican landraces, as well as its usefulness for characterization of genetic diversity in this species.

**Index words:** *Phaseolus vulgaris* L., genetic diversity, black bean, isozymes.

## INTRODUCCIÓN

México es reconocido como centro de origen y de diversidad de muchas especies, entre las que se encuentran aproximadamente 70 del género *Phaseolus*; de las que destaca por su importancia económica, social, biológica, alimenticia y cultural el frijol común (*P. vulgaris* L.). Por su superficie sembrada, es el segundo cultivo en importancia después del maíz (*Zea mays* L.). Además, su grano es un alimento básico que hace un notable aporte proteíco a la dieta humana, sobre todo en poblaciones rurales y urbanas de escasos recursos, y su uso está asociado a factores culturales debido a preferencias locales o regionales específicas. En México, la producción de frijol depende en alto grado de la diversidad genética de las poblaciones nativas, debido que la producción comercial está basada en este tipo de poblaciones.

Las primeras investigaciones realizadas para establecer las relaciones genéticas entre las especies del género *Phaseolus* se basaron en estudios de hibridación interespecífica y de similitud morfológica. En investigaciones recientes, con base en análisis de proteínas de semillas e isoenzimas se ha obtenido información valiosa acerca de la

distribución geográfica de la variabilidad genética de *P. vulgaris*. Mediante marcadores bioquímicos y moleculares de poblaciones silvestres y cultivadas de *Phaseolus* se han identificado dos centros de domesticación principales, América Central y los Andes (Gepts y Bliss, 1986; Koenig y Gepts, 1989, Singh *et al.*, 1991b). Las diferencias marcadas en morfología y patrones electroforéticos de las proteínas de las semillas, principalmente faseolina, entre las poblaciones silvestres de ambas regiones, apoyan la propuesta de la existencia de centros de domesticación independientes (Debouck y Tohme, 1989; Gepts y Debouck, 1991; Delgado-Salinas *et al.*, 1999). También ha sido posible establecer que las poblaciones de frijol silvestre se distribuyen específicamente en el occidente de México y en América Central (Delgado-Salinas *et al.*, 1988; Debouck y Tohme, 1989; Nabhan, 1990) y Sudamérica, particularmente, en Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y el noroeste de Argentina.

El análisis conjunto de características morfológicas, de adaptación, agronómicas y moleculares ha sugerido la existencia de razas dentro de los dos principales centros de origen de frijol común. De esta manera, en el acervo Mesoamericano se reconocieron las razas Durango, Jalisco y Mesoamericana; y en el acervo Andino las razas Chile, Perú y Nueva Granada (Singh *et al.*, 1991 a,b,c). La raza mesoamericana se caracteriza por presentar con mayor frecuencia los patrones isoenzimáticos  $Me^{98}$  y  $Dia-2^{105}$ ; la Durango  $Me^{102}$ ; y la Jalisco  $Me^{100}$  y  $Mdh-2^{102}$ . De las razas andinas, la Nueva Granada se caracteriza por los patrones isoenzimáticos  $Rbsc^{100}$  y  $Me^{100}$ ; la Chile  $Mdh^{100}$ ; y la Perú  $Mdh^{103}$  (Singh *et al.*, 1991c)

Hasta la fecha, en México no se han realizado estudios similares que permitan conocer con mayor precisión el tipo y la magnitud de la diversidad genética existente, ni tampoco las relaciones entre poblaciones de diferente origen. No obstante que la diversidad de la especie es amplia, ya que se le encuentra a lo largo y ancho del país, en diferentes altitudes y latitudes, en las más diversas condiciones climáticas y edáficas, y en múltiples sistemas de producción. Las diversas poblaciones nativas de frijol común muestran una gran variación en características fenotípicas como hábito de crecimiento, resistencia a enfermedades, precocidad y rendimiento, así como en forma, tamaño y color de semilla. De los diferentes tipos de frijol cultivados en el país, destacan las variedades de tipo negro que poseen un alto grado de diversidad y adaptación, cuyo consumo es particularmente preferido en el Centro y Sur del país, y su producción se realiza en diferentes condiciones climáticas y edáficas, sobre todo con variedades nativas.

Las variedades nativas juegan un papel importante en la agricultura nacional debido a que un gran porcentaje de la

superficie se cultiva con ellas. No obstante, éstas han sufrido un proceso continuo de erosión genética, principalmente debido a la sustitución de cultivos y de sistemas de producción, así como al desplazamiento de variedades regionales por mejoradas de mayor demanda comercial. La utilización del germoplasma nativo en los programas de mejoramiento tanto con fines de conservación como de aprovechamiento, ha sido limitado debido, en parte, por el desconocimiento del grado de diversidad y de divergencia genética entre cultivares negros procedentes de diferentes regiones del país, desconocimiento explicable por la falta de estudios orientados a la caracterización de la diversidad en forma sistemática. Como consecuencia, las variedades mejoradas de grano negro en México tienen una base genética muy estrecha; por ejemplo, todas las variedades obtenidas para el Noroeste del país comparten como progenitor común a Jamapa (Lépiz y Navarro, 1983).

La caracterización de poblaciones de frijol se ha basado tradicionalmente en la utilización de caracteres fenotípicos como hábito de crecimiento y color de flor o semilla, así como en los fenológicos como días a floración y madurez fisiológica, además de características asociadas con el rendimiento. Este tipo de caracteres tienen utilidad agronómica, pero no presentan una relación directa entre genotipo y fenotipo.

Las desventajas de los rasgos fenotípicos puede ser superada con el uso de variables neutrales como las isoenzimas, que se caracterizan por considerar mayor número de *loci* independientes (15 a 20), simplicidad y bajo costo; en contraste, presentan las desventajas de detectar un número limitado de *loci* polimórficos y de alelos por *locus* (Koenig y Gepts, 1989), y tener sensibilidad ambiental pero ésta puede reducirse mediante la estandarización de las condiciones de trabajo (Gepts *et al.*, 1992). Las isoenzimas se han aplicado en la caracterización genética del frijol (Singh *et al.*, 1991 a, b,c; Gepts *et al.*, 1986; Debouck *et al.*, 1993) y otras especies emparentadas, para determinar sus relaciones genéticas y para obtener información de los patrones geográficos en la variabilidad genética.

A pesar de que la información molecular que proporcionan las isoenzimas ha incrementado la comprensión de las relaciones evolutivas entre especies, este tipo de marcadores se han utilizado en un número restringido de estudios (Doebley, 1994), y en México hasta la fecha no se cuenta con antecedentes acerca de este tipo de estudios. La presente investigación se hizo con el objetivo de evaluar la diversidad genética de poblaciones de frijol común tipo negro nativas de México mediante isoenzimas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material genético

Se usaron 58 poblaciones de frijol tipo negro provenientes de diferentes regiones de la República Mexicana, proporcionadas por el Banco de Germoplasma "Ph. D. Salvador Miranda Colín" del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, del Programa de Mejoramiento Genético de Frijol del Colegio de Postgrados y de la Productora Nacional de Semillas (Cuadro 1).

### Análisis isoenzimático

Los análisis se realizaron con base en el protocolo del Laboratorio de Marcadores Genéticos, derivado de Stuber *et al.* (1988), en el Instituto de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgrados, ubicado en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

El extracto isoenzimático se obtuvo a partir de radículas de cinco plántulas de frijol generadas de semillas de cada población, previamente lavadas con agua destilada y tratadas con Metacaptán® (Metoxicloro + Captan), para reducir la contaminación por patógenos. La germinación de las semillas se hizo en charolas en una estufa de incubación (Modelo E62 V. C. A. 127 H260) a 26 °C y en oscuridad. Una muestra de 5 a 10 g de tejido de radículas de cada población, fue colocada en un tubo eppendorf de 1.5 µL previamente identificado, y se agregó 100 µL de solución amortiguadora de extracción con pH 7.5; el tejido se maceró con un taladro eléctrico, provisto de una punta de plástico; el tiempo máximo de maceración fue de 2 a 3 s con la finalidad de evitar el sobrecalentamiento y la desnaturización de las enzimas.

**Cuadro 1.** Poblaciones de frijol común (*P. vulgaris* L.) tipo negro utilizados.

Clave	Poblaciones	Origen	Clave	Poblaciones	Origen
CP1	MCK-1	Chalco, Mex.	CU2	Cue-2	Cuetzalan, Pue.
CP2	Negro Abolado	Edo. Méx.	CP10	N. Altiplano	Edo. de México
CP3	Negro Jamapa	Veracruz	CP11	Sataya 425	Sinaloa
CP4	Negro Perla	Edo. Méx.	CP12	Negro INIFAP	Edo. de México
CP5	Padre 48	Montecillos	CP13	N. Zacatecas	Zacatecas
CP6	N. Huasteco	Puebla	CP14	Negro Puebla	Puebla
CP7	Negro Nayarit	Nayarit	CP15	Negro Sinaloa	Sinaloa
CP8	N. Sesentano	Veracruz	CP16	Negro Tacaná	Chiapas
C-1*	Negro Criollo	Comitán, Chis.	CP17	N. San Luis	San Luis Potosí
C-2*	N. Puebla 150	Puebla	CP18	Nego Cotaxtla	Veracruz
CP9	N. de Enredo	Comitán, Chis.	CP19	N. Oaxaca 112	Oaxaca
A16	A-1638	Tsama, Yuc.	CP20	N. Tecomatlán	Oaxaca
CU1	Cue-1	Cuetzalan, Pue.	CP21	FCRM2	Guanajuato
N73	N6773	Zacatlán, Pue.	CP22	FCRM7	Guanajuato
N10	N8610	Tecámac, Méx.	CP23	FCRM44	Guanajuato
N84	N8884	Morelos	CP24	FCRM18	Guanajuato
N12	N9212	Acatlán, Hgo.	CP25	MCK-4	Cocotílán, Méx.
N18	N7818	Tamaulipas	CP26	MCK-3	Puebla
N80	N8010	Texcoco, Mex.	CP27	N. El Seco	Puebla
N61*	N4461	Pencuyut, Yuc.	CP28	N Bola Galicia	Edo. de México
N67	N7067	Oaxaca	CP29	N. Novoñito	Puebla
N16*	N9016	Tehuacán, Pue.	CP30	N. Jarocho	Veracruz
A15	A-155	Yucatán	N00	N9000	Veracruz
N93	N9093	Cuernavaca, Mor.	N60	N8960	Veracruz
N28	N6928	Guanajuato	N41	N4641	Yucatán
N65	N7265	Huasca, Hgo.	N46*	N9146	Huejotzingo, Pue.
N99*	N8799	Papantla, Ver.	CP31	N. Jayateco	Edo. de México
N37*	N6937	Chapingo, Mex.	C-3*	N. Tepetlixpa	Edo. de México
N03	N9003	Misantla, Ver.	CP32	N. San Cristobal	Puebla

\* Poblaciones que no mostraron bandas claras y que fueron descartadas del análisis estadístico.

Una vez terminada la maceración, el tejido se mantuvo en hielo. Para evitar contaminación, la punta de plástico se limpió con agua destilada y toallas de papel antes de la extracción de cada muestra. El extracto enzimático se colocó en una centrífuga GS-15R durante 20 min en 14 g. El sobrenadante se colocó en tubos eppendorf de 0.5  $\mu$ L. Los extractos finales se almacenaron a -80 °C en un ultracongelador.

De 21 isoenzimas analizadas sólo seis: Esterasa (Est), Malato deshidrogenasa (Mdh), Fosfohexosa isomerasa (Phi), Enzima mállica (Me), Diaforasa (Dia) y Ácido shikímico deshidrogenasa (Sad), mostraron polimorfismo entre *loci* y alelos por *loci* entre genotipos. Las variedades ICA-Pijao y Red Kidney se utilizaron como referencia, porque sus patrones de bandeo son conocidos (Koenig y Gepts, 1989; Singh *et al.*, 1991a).

La nomenclatura utilizada para cada alelo en cada *locus* se determinó por la abreviatura de las primeras letras de la enzima y por su distancia de migración, la cual varió de 85 (migración corta o lenta) a 115 (migración rápida o larga). La distancia de migración entre cada alelo se midió en milímetros a partir del inicio del corrimiento en el borde inferior del zimograma, cuya lectura se hizo visualizando patrones de bandeo en una lámpara luminosa (FI5T810 15 watts), medir las distancias de cada banda y registrar los patrones de bandeo en papel milimétrico, para tener un patrón de registro estándar.

#### Análisis de la diversidad genética

De los análisis de las isoenzimas se calcularon las frecuencias génicas de cada población, el número promedio de alelos por *locus* (Brown y Weir, 1983; Ayala y Kiger, 1984) y el porcentaje promedio de *loci* polimórficos (Brown y Weir, 1983; Pasteur *et al.*, 1988; Ayala y Kiger, 1984). Se consideraron como polimórficos a los *loci* en los que la frecuencia del alelo más frecuente no fuera superior a 95 %. Se utilizó el programa POPGENE (Yeh, 1999) para el cálculo de estos parámetros genéticos, con base en 16 *loci* isoenzimáticos con acción génica codominante.

Se hizo también un análisis de componentes principales con las frecuencias génicas, en 47 variables originales, mediante la matriz de varianzas-covarianzas. En adición, se estimaron las distancias genéticas de Nei (1972) entre poblaciones, con las cuales se realizó un análisis de conglomerados de agrupación jerárquica mediante el método de ligamiento promedio (UPGMA), a partir del cual se obtuvo el dendograma correspondiente con el programa NTSYS (Rohlf, 1993).

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las poblaciones C-1, C-2, N61, N16, N99, N37, N64 y C-3 no mostraron buena resolución, por lo que fueron descartadas del análisis. De 21 sistemas enzimáticos sólo seis mostraron polimorfismo: Ácido shikímico deshidrogenasa (SAD), Diaforasa (DIA), Enzima mállica (ME), Esterasa (EST), Fosfohexosa isomerasa (PHI) y Malato deshidrogenasa (MDH). Los *loci* monomórficos fueron Phi-A, Phi-B, Dia-A y Me-A, y los polimórficos (entre paréntesis el número de alelos por *locus*) Sad-A (2), Sad-B (2), Phi-C (2), Est-A (3), Est-B (5), Mdh-B (4), Dia-B (4), Dia-C (7), Dia-D (4), Dia-E (5) y Me-B (5).

De 16 *loci* 11 fueron polimórficos, lo que representa un polimorfismo de 68.7 %. Esta proporción es más alta que la reportada previamente para esta especie; Paredes y Gepts (1993) encontraron que de 14 *loci* sólo nueve fueron polimórficos (64 %); Koenig y Gepts (1989) en 14 enzimas encontraron 22 *loci*, de los cuales sólo diez fueron polimórficos (45 %); Weeden (1984a) reportó 67 % de polimorfismo; Chase *et al.* (1991) encontraron 64 %; únicamente Becerra y Gepts (1993) encontraron un polimorfismo de 70 %, superior al encontrado en este estudio.

El grado de polimorfismo aquí detectado muestra que en las poblaciones de frijol negro estudiadas hay una amplia variación genética, similar o mayor a la encontrada por otros autores en otros grupos poblacionales. Tal polimorfismo es comparable al reportado en otras especies como *P. lunatus*, en la que Maquet *et al.* (1993) encontraron en 17 isoenzimas con 25 *loci*, de los cuales sólo 17 fueron polimórficos (74 %); Lioi y Lotti (1996) y Zoro *et al.* (1996) estimaron porcentajes de polimorfismo del orden de 41 y 50 %, respectivamente. El grado de polimorfismo encontrado en este grupo de poblaciones puede ser considerado relativamente alto, dado el número de alelos simples (47) y de formas híbridas (6) observadas en 16 *loci*.

El grado de polimorfismo por *locus* fluctuó de uno a seis, y en promedio fue de tres alelos por *locus*; este valor es mayor al de 2.1 reportado por Singh *et al.* (1991a) en *P. vulgaris*. En *P. lunatus* Lioi y Loti (1996) detectaron 1.53 y Flórez *et al.* (1997) reportaron 2.47 en *P. acutifolius*. El *locus* que presentó un mayor número de alelos (6) fue Dia-C y los *loci* con menor número de alelos (1) fueron Phi-A, Phi-B, Mdh-A, Dia-A y Me-A, debido a que en el grupo de poblaciones de tipo negro estudiado estos alelos ya están fijados.

Las variables de mayor importancia y contribución a los componentes principales, que explican en mayor proporción la variación observada, se definieron con base en

los vectores característicos de las variables originales con los componentes principales, con valores superiores a 0.3. Los tres primeros componentes explicaron 62 % de la varianza total; (Cuadro 2) los alelos DiaC<sup>90</sup>, DiaC<sup>100</sup>, DiaD<sup>100</sup>, DiaD<sup>105</sup>, DiaE<sup>100</sup> y DiaE<sup>105</sup>, tuvieron una importante contribución en la determinación del primer componente; el segundo componente estuvo determinado fundamentalmente por los alelos DiaB<sup>100</sup>, DiaB<sup>110</sup>, PhiC<sup>110</sup>, EstB<sup>110</sup> y MdhB<sup>110</sup> (datos no mostrados). Estos resultados difieren de los encontrados por Debouck *et al.* (1993), quienes hallaron que su componente principal 1 estuvo relacionado con los *loci* Lap-3, Me y Sad y el CP2 con Prxc, Me y Sad; en este caso los *loci* Me y Sad influyeron en ambos componentes. Las diferencias entre ambos estudios, en los *loci* que explican los primeros componentes principales, pueden deberse a los distintos orígenes del germoplasma caracterizado, así como a las diferentes enzimas analizadas.

Cuadro 2. Valores característicos del análisis de componentes principales y proporción explicada para 50 poblaciones de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) tipo negro, con base en la matriz de varianza-covarianza.

Componente principal	valor característico	Proporción de varianza	
		Explicada (%)	Acumulada (%)
1	1.0461	35.32	35.32
2	0.4830	16.31	51.63
3	0.311	10.52	62.14

La representación gráfica de la dispersión de la variabilidad de las 50 poblaciones caracterizadas (Figura 1) mostró que en el cuadrante I se localizaron poblaciones provenientes principalmente de Oaxaca, Estado de México, Puebla, Yucatán y Zacatecas, y en menor proporción de Chiapas, San Luis Potosí, Veracruz y Guanajuato; nótese que todas las poblaciones de Yucatán formaron un subgrupo. Este grupo poblacional se caracterizó por una amplia variación, ya que incluyó cultivares de origen diferente, una mayor proporción de los alelos PhiC<sup>110</sup>, EstB<sup>110</sup>, MdhB<sup>100</sup>, DiaB<sup>100</sup>, DiaC<sup>90</sup>, DiaD<sup>105</sup>, DiaE<sup>105</sup> y MeB<sup>100</sup>, y porque contenía el alelo EstB<sup>105</sup>, que fue una forma exclusiva de este cuadrante. El grupo, además de tener la mayor variación, incluyó también una mayor cantidad (14) de poblaciones nativas (CP1, CP9, CU-2, CP24, N67, N41, A-15, A-16, CP19, CP31, CP17, CP8, N65 y N84).

Las poblaciones agrupadas en el cuadrante II provenían de Sinaloa, Morelos, Veracruz, Chiapas, Estado de México y Puebla, aproximadamente en el mismo número, con excepción de dos poblaciones originarias de Veracruz. En este cuadrante se agruparon en mayor grado los cultivares mejorados y dos poblaciones nativas (CU-2 y N93). Las poblaciones de este cuadrante se caracterizan por los alelos PhiC<sup>100</sup>, EstB<sup>100</sup>, MdhB<sup>100</sup>, DiaB<sup>100</sup>, DiC<sup>100</sup>, DiaD<sup>100</sup>, y MeB<sup>100</sup>, con DiaE<sup>115</sup> como alelo exclusivo.

En el cuadrante III las poblaciones agrupadas son originarias de los estados de Veracruz, México, Hidalgo y

Nayarit; los alelos predominantes en este grupo fueron PhiC<sup>100</sup>, EstB<sup>110</sup>, MdhB<sup>110</sup>, DiaB<sup>110</sup>, DiaC<sup>100</sup>, DiaD<sup>110</sup>, DiaE<sup>110</sup> y MeB<sup>90</sup>; el alelo EstA<sup>95</sup> fue exclusivo para el grupo de poblaciones de este cuadrante.

En el cuadrante IV predominaron las poblaciones nativas y sólo se encontraron dos variedades mejoradas (CP14 precoz y CP4 tardía); las poblaciones de los estados de Puebla y México predominaron, con menor proporción de Veracruz, Guanajuato y Oaxaca. Las poblaciones de este cuadrante se caracterizaron por una mayor frecuencia de los alelos PhiC<sup>100</sup>, EstB<sup>110</sup>, MdhB<sup>100</sup>, MdhB<sup>110</sup>, DiaB<sup>100</sup>, DiaC<sup>90</sup>, DiaD<sup>105</sup>, DiaE<sup>105</sup>, y MeB<sup>100</sup>; DiaB<sup>95</sup>, DiaC<sup>88</sup>, DiaC<sup>110</sup> y DiaE<sup>95</sup> fueron los alelos exclusivos.

Las poblaciones procedentes del Estado de México y Veracruz se localizaron en los cuatro cuadrantes, lo que indica el amplio rango de variación de *Phaseolus* existente en estos estados. Esta amplitud de la variación genética puede ser consecuencia de la variación climática y edáfica existente en estos estados, que ha dado lugar a un gran número de variedades de frijol con adaptación específica. Las variedades de Guanajuato se localizaron en tres cuadrantes (I, II y IV). Sólo en dos cuadrantes se observan las variedades de Puebla (I y IV), Chiapas (I y II), Oaxaca (I y IV) e Hidalgo (I y III), y las de Sinaloa sólo se encontraron en el I. La mayoría de las poblaciones nativas se localizaron en los cuadrantes I y IV, que se caracterizan por presentar la mayoría de los alelos, y que muestran una amplia variación genética.

Las variedades mejoradas se agruparon principalmente en los cuadrantes II y III, que incluyen poblaciones provenientes principalmente de zonas intermedias y bajas, aunque también algunas de zonas altas como CP10 (Negro Altiplano); la inclusión de estos últimos puede ser debida al origen de sus progenitores.

El dendograma construido con base en las distancias de Nei estimadas con las frecuencias alélicas de 16 *loci* enzimáticos (Figura 2) permitió la definición de siete grupos y tres subgrupos en orden descendente en una distancia genética de 0.14. El grupo I se integró con 30 poblaciones, que incluye poblaciones de todos los orígenes estudiados (Yucatán, Chiapas, Veracruz, Puebla, Oaxaca, Zacatecas, Estado de México, Guanajuato e Hidalgo), por lo que fue el más diverso. Este grupo se dividió en tres subgrupos: el primero (IA) se formó con ocho variedades de origen diferente, de CP1 a CP31; en el subgrupo IB se encontraron poblaciones procedentes del centro del país y del Golfo de México, principalmente; y el subgrupo IC se caracterizó por contener poblaciones nativas. El grupo II se formó con dos poblaciones nativas, una de Chiapas (CP9) y otra de

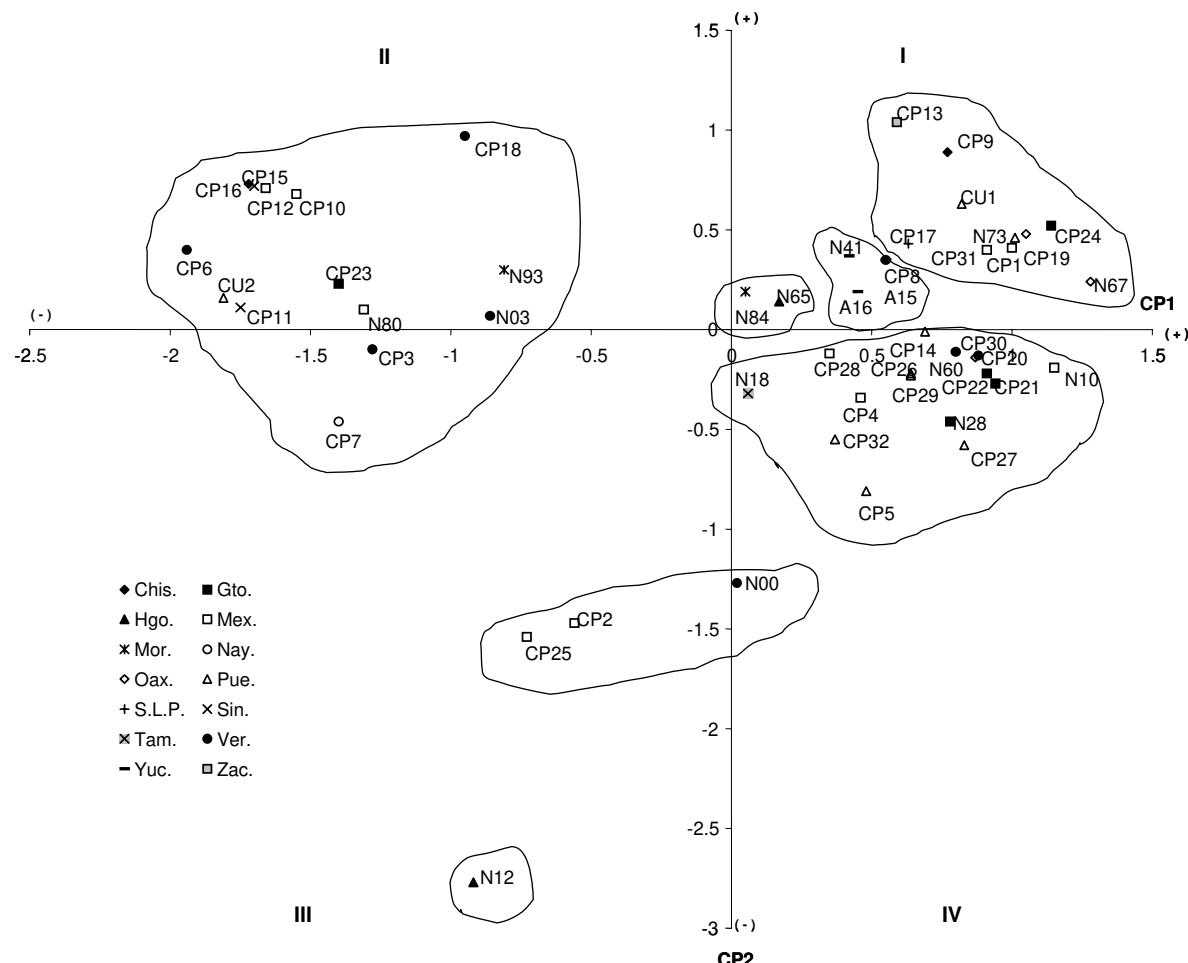


Figura 1. Distribución espacial de 50 poblaciones de frijol común (*P. vulgaris L.*) tipo negro con base en los dos primeros componentes principales.

Yucatán (N41), así como con una mejorada de Zacatecas (CP13). El grupo III se formó con una población nativa de Tamaulipas (N18). El grupo IV con una de Puebla (N73). El grupo V se formó con tres poblaciones nativas (N00, CP25 y CP2). El grupo VI se constituyó con 14 poblaciones, desde CP3 del estado de Veracruz hasta CP18 del mismo estado, más genotipos provenientes de varios estados (Veracruz, Hidalgo, Puebla, Nayarit, Sinaloa, Chiapas, Guanajuato, Morelos y Estado de México), por lo que fue también un grupo diverso. El grupo VII se formó con una sola población proveniente del estado de Hidalgo (N12).

En el Cuadro 3 se presentan las aloenzimas más frecuentes en los grupos y subgrupos del dendrograma, así

como las variedades representativas de los grupos. La diversidad genética encontrada en los genotipos de frijol común tipo negro, con base en características aloenzimáticas confirma el alto grado de diversidad genética encontrada en genotipos del acervo Mesoamericano mediante aloenzimas y faseolina (Gepts *et al.*, 1986; Gepts y Bliss, 1986; Koenig y Gepts, 1989; Singh *et al.*, 1991 a,b).

Los grupos III, IV y VII están integrados básicamente con poblaciones nativas, lo que muestra con claridad el grado de diversidad genética presente en estas poblaciones. En particular resalta N12 (grupo VII) originario del estado de Hidalgo, ya que todos los alelos que lo caracterizan son diferentes a los demás grupos, con excepción de Est-B<sup>112</sup>.

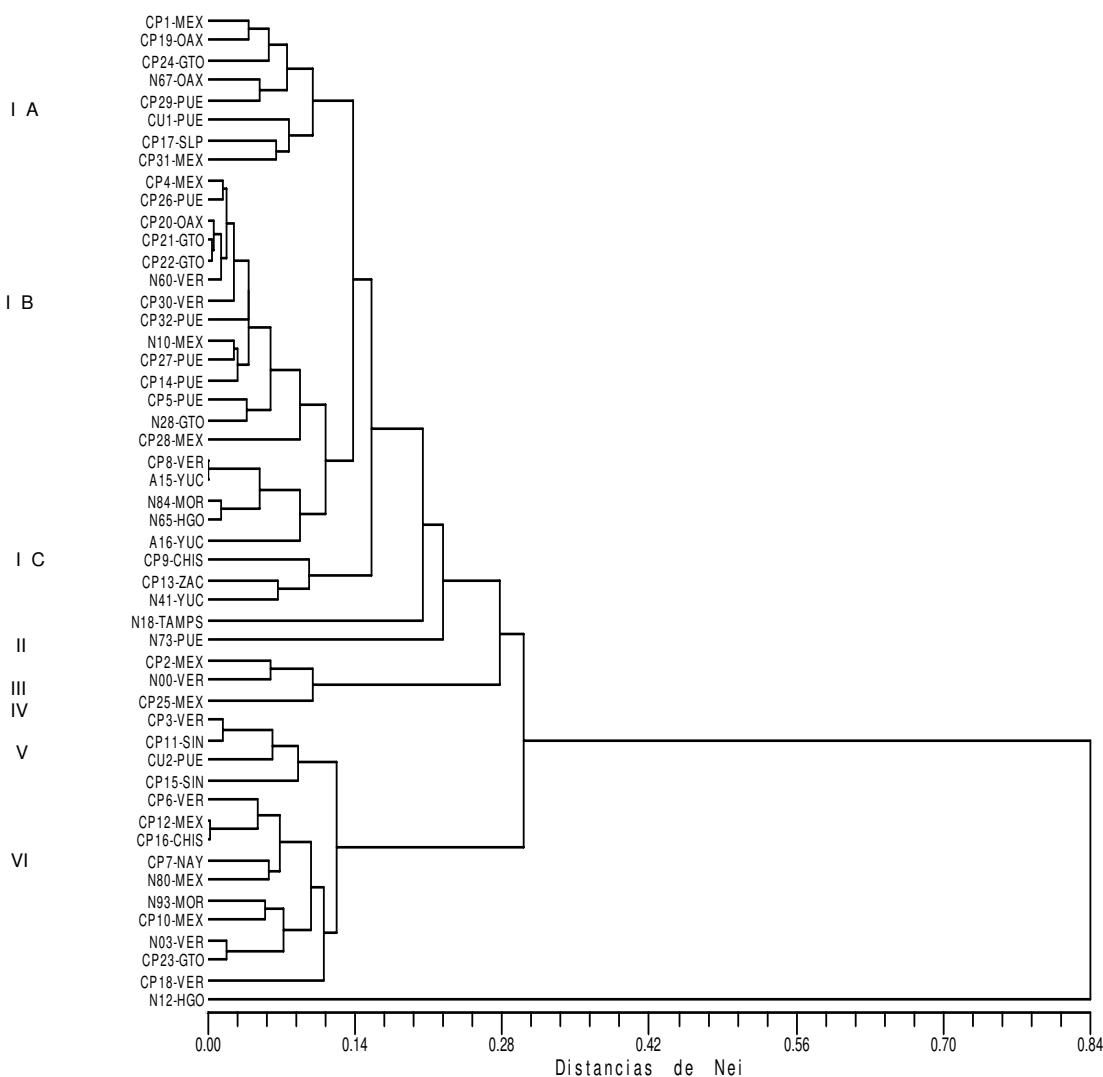


Figura 2. Dendrograma de la diversidad aloenzimática en 50 poblaciones de frijol tipo negro. A la izquierda la clave y origen de cada genotípico. Los números romanos (I a VII) indican los grupos y las letras (A, B y C) los subgrupos.

Cuadro 3. Características aloenzimáticas y poblaciones representativas en siete grupos de frijol común tipo negro formados a partir del análisis de conglomerados de 50 poblaciones.

Grupo*	Sub-Grupo*	Poblaciones*	Característica aloenzimática**	Poblaciones representativas
	1A	CP1 - CP31	Dia-B <sup>100</sup>	San Luis, Oaxaca 12, Noventeño, Jayateco.
I	1B	CP4 - CP28	Est-B <sup>110</sup> , Me-B <sup>100</sup>	Perla, P-48, Puebla, Bola Galicia, Jarocho
	1C	CP8 - A16	Dia-C <sup>90</sup> , Dia-B <sup>100</sup>	Sesentano y Nativos de Yucatán.
II		CP9 - N41	Mdh-B <sup>100</sup> , Dia-C <sup>90</sup> , Dia-D <sup>105</sup> , Dia-E <sup>105</sup>	Zacatecas, Nativos de Chiapas y Yucatán
III		N18	Est-B <sup>112</sup> , Mdh-B <sup>100</sup> , Me-B <sup>110</sup>	Criollo de Tamaulipas
IV		N73	Est-B <sup>115</sup> , Dia-C <sup>90</sup> , Dia-D <sup>105</sup> , Dia-E <sup>105</sup> Me-B <sup>105</sup> , Phi-C <sup>110</sup>	Criollo de Puebla
V		CP2 - CP25	Est-B <sup>110</sup>	Abolado
VI		CP3 - CP18	Mdh-B <sup>100</sup> , Phi-C <sup>110</sup>	Jamapa, Sataya 425, Sinaloa, Huasteco, Tacana, Altiplano
VII		N12	Sad-A <sup>90</sup> , Sad-B <sup>90</sup> , Est-A <sup>95</sup> , Est-B <sup>112</sup> Dia-C <sup>105</sup> , Dia-D <sup>110</sup> , Dia-E <sup>110</sup> , Me-B <sup>90</sup>	Criollo de Hidalgo

\* Grupos, subgrupos y poblaciones del dendrograma (Figura 2).

\*\* Dia = Diaforasa; Est = Esterasa; Mdh = Malato deshidrogenasa; Me = Enzima mática; Phi = Fosfato isomerasa; Sad = Ácido shikímico deshidrogenasa. La letra mayúscula indica el locus y el número superíndice indica el alelo.

## DISCUSIÓN

### Congruencia entre el análisis de componentes principales y el de conglomerados

La concordancia entre ambos tipos de análisis fue bastante alta. La visualización de grupos específicos determinados por el análisis de conglomerados fue mejor en la representación gráfica de los componentes principales 1 y 2, ya que de esta manera fue posible clasificar a las poblaciones en los grupos en forma más acorde a su área de adaptación climática (Figura 1).

### Grado de diversidad

La gran variación genética detectada correspondió con la diversidad fenotípica observada (datos no presentados). Se identificaron tres agrupamientos mayores y cuatro menores. En el cuadrante I se localizaron variedades nativas, la mayoría de ellas tardías, de hábitos III y IV, con adaptación a altitudes elevadas y tamaño de semilla de pequeño a mediano, provenientes principalmente de sitios distintos a los Valles Altos y con muy poca representación de germoplasma del estado de México. Un segundo grupo se integró con 13 poblaciones localizadas principalmente en el cuadrante II y dos poblaciones del tercer cuadrante. Este grupo destaca porque involucra variedades con hábitos de crecimiento I y II, de precocidad alta a intermedia, y adaptadas a altitudes bajas a intermedias; incluye principalmente variedades mejoradas con muy poca variación alélica, lo que refleja fijación de alelos específicos.

Las variedades del grupo 2 son de semilla pequeña, por lo que podrían considerarse como típicos de la raza Mesoamericana; una de las poblaciones típicas de esta raza es el Negro Jamapa que se encuentra en este grupo de clasificación. Notablemente, en este grupo se localizó una serie de variedades mejoradas provenientes tanto del trópico húmedo y seco como de los Valles Altos. Tal es el caso de las variedades tropicales N. Jamapa, N. Sinaloa, N. Cotaxtla, N. Huasteco, N. Sataya 425, N. Tacaná y N. Nayarit, así como de Valles Altos (N. Altiplano y N. INIFAP). La escasa diversidad entre poblaciones mejoradas fue evidente, lo cual puede ser consecuencia de que estas variedades comparten germoplasma de progenitores comunes, como en el caso de las variedades Sataya 425, Negro Sinaloa y Negro Nayarit, que comparten a Jamapa, de origen tropical, como progenitor común (Lépiz y Navarro, 1983). Algunas variedades de origen tropical han mostrado, en general, buena adaptación a los Valles Altos, aunque lo contrario normalmente no ocurre.

Un tercer grupo se localizó exclusivamente en el cuarto cuadrante. En este caso el grupo de poblaciones comprendió variedades nativas y mejoradas provenientes de los Valles Altos, principalmente de los estados de México y Puebla; incluye variedades precoces como Negro Perla, intermedias como P-48 y tardías como N. Puebla y N. Noventenario de hábito determinado e indeterminado y de semilla pequeña o mediana. Entre estos tres grupos se localizaron dos subgrupos cuyas características podrían considerarse intermedias; uno de estos subgrupos estuvo compuesto con poblaciones provenientes de Hidalgo y Morelos, los cuales podrían tener similitudes genéticas debido a la similitud de ambientes de adaptación.

Además de estos conglomerados se integraron otros dos grupos, uno formado principalmente con poblaciones nativas del estado de México, una de las cuales tiene características de grano mediano redondo, muy distinto al de las poblaciones nativas y mejoradas regionales. Es posible que diferencias similares se tengan en los otros dos integrantes de este grupo, uno proveniente del área de Chalco y otro de Álamo, Veracruz, aspecto que sería necesario verificar. Por lo anterior, es posible que este grupo varietal posea alelos característicos que los diferencien de los otros.

En forma separada se tuvo a N12, población nativa proveniente de Hidalgo. Esta población mostró la mayor distancia respecto a las otras poblaciones. Este comportamiento genético concuerda completamente con los resultados obtenidos en la caracterización fenotípica (datos no presentados), ya que posee los mayores valores en ancho de la vaina, y en longitud y anchura de la semilla; además es una de las poblaciones más precoces.

La amplia dispersión registrada refleja la amplitud de la variación genética existente en este grupo de poblaciones de grano negro, a pesar de ser similares en el tipo de semilla. Al mismo tiempo se observa que esta dispersión no es aleatoria, ya que es posible establecer grupos con base en sus áreas de adaptación climática más, que por localidades o entidades de origen.

Las poblaciones provenientes de los estados de México, Veracruz y Puebla mostraron una amplia diversidad genética, la cual podría deberse a la amplitud de nichos ecológicos y a la diversidad de condiciones climáticas y edáficas existentes. Tal magnitud de diversidad debe esperarse también en entidades como Chiapas y Oaxaca, cuya diversidad climática es también grande. Hidalgo es un caso especial, ya que mostró la mayor diversidad genética, con grandes diferencias alélicas entre sus poblaciones. Es necesario incluir en futuros estudios una mayor representatividad de muestras provenientes de Hidalgo, Durango, Jalisco,

Chihuahua, Zacatecas, Quintana Roo, Guerrero, Michoacán, entre otros.

### Muestreo y representatividad

Se detectaron alelos y *loci* no reportados anteriormente en la literatura, lo que pudo obedecer a la naturaleza del germoplasma estudiado que incluye 50 poblaciones, la mayoría de ellas nativas provenientes de diversos estados de México y adaptadas a diferentes condiciones climáticas y de altitud. Aunque se procuró tener una buena representatividad, es indudable que algunas regiones no fueron suficientemente representadas e incluso no fue posible su inclusión debido a la falta de disponibilidad de germoplasma al momento de la realización del estudio. El alto grado de diversidad genética detectado en los estados de Veracruz, México, Hidalgo y Puebla, nuevamente plantea la necesidad de estudios subsecuentes con mayor número de poblaciones suficientemente identificadas, así como una mayor representatividad regional.

### CONCLUSIONES

El análisis isoenzimático permitió establecer patrones de variación alélica en poblaciones de frijol común tipo negro, con base en las distancias de migración y posiciones relativas de *loci* y de variantes alélicas. La diversidad genética no fue aleatoria, ya que fue posible establecer grupos de germoplasma con base en áreas de adaptación climática. La mayor diversidad se detectó en germoplasma de los estados de Hidalgo, México, Puebla y Veracruz, que conforman una especie de franja continua de zonas intermedias a altas, con la posible influencia de germoplasma proveniente de las zonas bajas pero con adaptación al Altiplano. Tal diversidad genética podría ser el producto de la diversidad climática y edáfica presente en esas regiones, así como a los movimientos de semillas que practican los agricultores y al incremento de la comercialización de frijol que ha permitido la dispersión de germoplasma entre regiones distantes.

### AGRADECIMIENTOS

Al Sr. Juan Carlos Zaragoza Ramírez, por el apoyo brindado para la realización del trabajo de laboratorio.

### BIBLIOGRAFÍA

- Ayala F J, J A Kiger (1984)** Genética Moderna. Fondo Educativo Interamericano. Barcelona. 836 p.
- Becerra V L, P Gepts (1993)** Characterization of the genetic diversity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) using RFLP markers: *In: Phaseolus Beans Advanced Biotechnology Research Network*. W M Roca, J E Mayer, M A Pastor-Corrales, J Tohme (eds). CIAT, Colombia. pp:53-59.
- Brown A D H, B S Weir (1983)** Measuring genetic variability in plant populations. *In: Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A*. S D Tanksley, T J Orton (eds). Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp: 219-240.
- Chase C D, V M Ortega, C E Vallejos (1991)** DNA restriction fragment length polymorphisms correlate with isozyme diversity in *Phaseolus vulgaris* L. *Theor. Appl. Gen.* 81: 806-811.
- Debouck D G, O Toro, O M Paredes, W C Johnson, P Gepts (1993)** Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) in Northwestern South America. *Econ. Bot.* 47: 408-423.
- Debouck D G, J Tohme (1989)** Implications for bean breeders of studies on the origins of common beans, *Phaseolus vulgaris* L. *In: Current Topics in Breeding of Common Bean*. S Beebe (ed). CIAT, Colombia. pp: 3-42.
- Delgado-Salinas A, A Bonet, P Gepts (1988)** The wild relative of *Phaseolus vulgaris* in Middle America. *Gen. Res. Phaseolus Beans* pp:163-184.
- Delgado-Salinas A, T Turley, A Richman, M Lavin (1999)** Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). *Sist. Bot.* 24: 438-460.
- Flórez R C P, D Debouck, A Gutiérrez (1997)** Patrones de diversidad genética y domesticación en frijol Tepari (*Phaseolus acutifolius* Aza Gray). *Acta Agronómica* 47: 19- 24.
- Gepts P, D Debouck (1991)** Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *In: Common Beans: Research for Crop Improvement*. A Schoonhoven, O Voyst (eds). CAB International and CIAT, Colombia. pp: 7-53.
- Gepts P, F A Bliss (1986)** Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. *Econ. Bot.* 40:469-478.
- Gepts P, T C Osborn, K Rashka, F A Bliss (1986)** Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. *Econ. Bot.* 40: 451-468.
- Gepts P, V Llaca, R O Nodari, L Panella (1992)** Analysis of seed proteins, isozymes, and RFPLs for genetic and evolutionary studies in *Phaseolus*. *In: Modern Methods of Plant Analysis*, Vol. 14. M F Linskens, J F Jackson (eds). Germany. pp:63-93
- Koenig R, P Gepts (1989)** Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of genetic diversity. *Theor. Appl. Gen.* 78: 809-817.
- Lioi L, C Lotti (1996)** Allozyme variability in cultivated lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 39:249.
- Lépiz I R, F J Navarro (1983)** Frijol en el Noroeste de México (Tecnología de Producción). Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México. 69 p.
- Maquet A, B Wathelet, J P Baudoin (1993)** A study on isozyme polymorphism in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *In: Phaseolus Beans Advanced Biotechnology Research Network*. W M Roca, J E Mayer, M A Pastor-Corrales, J Tohme (eds). CIAT, Colombia. pp:87-96.
- Nabhan G P (1990)** Wild *Phaseolus* ecogeography in the Sierra Madre Occidental, México: Areographic techniques for tagetting and conserving species diversity. Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genepools 5. International Board for Plant Genetic Resources, Italia. pp:1-35
- Paredes O M, P Gepts (1993)** Genetic diversity, segregation and recombination in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *In: Phaseolus Beans Advanced Biotechnology Research Network*. W M Roca, J E Mayer, M A Pastor-Corrales, J Tohme (eds). CIAT, Colombia. pp:60-68.
- Pasteur N, G Pasteur, F Bonhomme, J Catalan, J Britton-Davidian (1988)** Practical Isozyme Genetics. Ellis Horwood Limited. Chichester, England. 215 p.
- Rohlf J F (1993)** NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Ver. 1.80). Stony Brook, NY USA.

- Singh S P, R Nodari, P Gepts (1991a)** Genetic diversity in cultivated common bean: I. Allozymes. *Crop Sci.* 31: 19-23.
- Singh S P, J A Gutiérrez, A Molina, C Urrea, P Gepts (1991b)** Genetic diversity in cultivated common bean: II. Marker-based analysis of Morphological and Agronomic Traits. *Crop Sci.* 31: 23-29.
- Singh S P, P Gepts, DG Debouck (1991c)** Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Econ. Bot.* 45: 379-396.
- Stubert C W, J F Wendel, M M Goodman, J S C Smith (1988)** Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). *Technical Bulletin* 286. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina. 87 p.
- Weeden N F (1984a)** Identification of white seeded snap bean cultivars with the aid of isozyme phenotype. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 27:22.
- Weeden N F (1984b)** Linkage between the gene coding the small subunit of ribulose bisphosphate carboxylase and the gene coding malic enzyme in *Phaseolus vulgaris* L. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 27: 123-124.
- Yeh C F (1999)** Population Genetic Analysis (POPGENE Ver. 1.31): Quick user guide. University of Alberta. Edmonton, Canada. 29 p.
- Zoro I B I, A Maquet, B Wathelet, JP Baudoin (1996)** New isozymes markers for the study of the gene pool *Phaseolus lunatus* L. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 39:247-248.