

# VARIABILIDAD MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE CULTIVARES CRIOLLOS Y MEJORADOS DE FRIJOL COMÚN EN TABASCO, MÉXICO

## MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR VARIABILITY AMONG NATIVE AND COMERCIAL CULTIVARS OF BLACK BEAN IN TABASCO, MÉXICO

Abel Vidal-Barahona<sup>1</sup>, Luz del Carmen Lagunes-Espinoza<sup>2\*</sup>, Ernestina Valadez Moctezuma<sup>3</sup> y Carlos Fredy Ortiz-García<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa en Producción Agroalimentaria en el Trópico, y <sup>2</sup>Área de Ciencia Vegetal, Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. Periférico Carlos A. Molina s/n. 86500, H. Cárdenas, Tabasco. Fax: 01 (937) 372-2297. <sup>3</sup>Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma de Chapingo. Km. 38.5. Carr. México-Texcoco. 56230 Chapingo, Edo. de México.

\*Autor para correspondencia (lagunes@colpos.mx)

### RESUMEN

La variabilidad genética entre siete cultivares criollos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) colectados en la región de la Chontalpa, Tabasco, México, y 14 cultivares mejorados fue evaluada con marcadores morfológicos y moleculares tipo RAPD e ISSR. Un alto nivel de cercanía entre los dos tipos de cultivares para las 19 características morfológicas evaluadas fue establecido por el análisis de componentes principales. Los genotipos criollos se asociaron con los mejorados. Entre los cultivares criollos, 'Frijol Pondoy', 'Frijol Negro, criollos 16 y 17' y 'Dos meses' mostraron una estrecha cercanía a nivel espacial, relacionada con las variables peso de biomasa aérea, tasa de crecimiento de la semilla y proporción de pericarpio, principalmente. El análisis de agrupamiento basado en los datos de similitud genética de marcadores RAPD-ISSR estimada con el coeficiente de Dice, mostró una baja variabilidad entre genotipos. Así, a nivel intra-especie de *P. vulgaris* el grado de parentesco entre genotipos de frijol negro evaluados es alto; la diferencia entre ellos es de 6 %, lo que indica que los cultivares criollos de la región tienen ancestros en común con las variedades mejoradas o líneas utilizadas en los programas de mejoramiento genético del frijol negro en el país y que han adquirido una adaptación especial a las condiciones húmedas de Tabasco, producto de la selección ejercida por los agricultores de la región.

**Palabras claves:** *Phaseolus vulgaris*, RAPD, ISSR, variación fenotípica, variación genotípica.

### SUMMARY

Genetic variability among seven native black bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) collected in La Chontalpa, Tabasco, México, and 14 improved varieties were evaluated regarding morphological and molecular markers, such as RAPD and ISSR. The principal component analysis indicated that both types of varieties are highly related. Native genotypes are related to the improved ones. Among the native landraces, 'Pondoy native bean', 'Black native bean 16 and 17' and 'Two months' showed a close spatial link, related to the variables aerial biomass dry weight, growth seed rate, and pod wall pro-

portion. The cluster analysis based on the genetic similarity data of RAPD-ISSR markers which was estimated with Dice Coefficient, showed low variability among genotypes, thus showing a close kinship among the black bean genotypes, which have a difference of only 6 %. It is inferred that native varieties have common ancestors with the improved varieties or lines used for black bean breeding programmes in México. These varieties have achieved some especial adaptation to the humid environmental conditions of Tabasco, due to the selection carried out by local farmers.

**Index words:** *Phaseolus vulgaris*, RAPD, ISSR, phenotypic variability, genotypic variability.

### INTRODUCCIÓN

El cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) en México tiene gran tradición desde antes de la conquista, lo que se manifiesta en la amplia diversidad de las formas silvestres y cultivadas que existían y en los usos culinarios en los que interviene (Pérez *et al.*, 1994). Si bien la mayor diversidad de *P. vulgaris* en el país se localiza a lo largo de la Sierra Madre Occidental entre los 500 y 1800 m de altitud (Miranda, 1967), su cultivo se realiza extensivamente en casi todas las condiciones agroecológicas del país y sistemas de producción.

En el trópico húmedo del Estado de Tabasco, las formas cultivadas de *P. vulgaris* de amplio uso entre los agricultores eran los cultivares criollos 'Dos meses', 'Tres meses' y 'Nacajuca' (Degand *et al.*, 1994). Estos cultivares han coexistido con otros mejorados al menos durante 40 años, por ejemplo, con la variedad 'Jamapa' que fue liberada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en 1958. Los

cultivares criollos tienen la ventaja de estar adaptados a las condiciones ambientales del trópico húmedo (baja altitud y altas temperaturas y precipitación) y a los sistemas de producción que emplean bajos insumos. Esto los hace valiosos como donadores potenciales de genes para el desarrollo y mantenimiento de variedades modernas y para su mejora y uso directo por los agricultores de la región (Chávez *et al.*, 2003).

Tradicionalmente la variabilidad intra e inter específica de *P. vulgaris*, se ha evaluado a través de características morfológicas, las que incluyen las agronómicas (Voysset *et al.*, 1994). La combinación de estos estudios con técnicas moleculares ha permitido una mejor diferenciación y caracterización, ya que ambos tipos de análisis son complementarios en estudios de diversidad y estructura genética de las poblaciones y en la caracterización agronómica y productiva (Valadez y Kahl, 2000).

El análisis del ADN para detección de polimorfismos tipo RAPD (polimorfismo en el ADN amplificado por secuencias aleatorias) y de MP-PCR (inter-secuencias simples repetidas, ISSR) ha mostrado ser una estrategia rápida y eficiente para evaluar la diversidad o variabilidad genética (Gilbert *et al.*, 1999) y para identificar cultivares estrechamente relacionados (Valadez *et al.*, 2001). Con la técnica RAPD se han evaluado los cambios en la diversidad genética de *P. vulgaris* asociados con la selección de la resistencia a enfermedades (Beebe *et al.*, 1995) y se ha estudiado la variabilidad genética intra especie (Gómez *et al.*, 2004). Los ISSR se han usado para estudiar la estructura de la diversidad genética inter e intra especie (Katzir *et al.*, 2000), y han demostrado ser eficientes para diferenciar grupos varietales en la colección de frijol comercial del INIFAP (Rosales *et al.*, 2003) y de poblaciones estrechamente relacionadas como las silvestres y domesticadas de *P. vulgaris* de la Sierra Norte de Puebla (González *et al.*, 2005).

En *P. vulgaris* la mayoría de los estudios sobre diversidad genética se han hecho en muestras que representan orígenes geográficos amplios, con la finalidad de identificar subdivisiones en su germoplasma; tal es el caso de grupos genéticos y razas (Gepts, 1998). Pocos estudios se han hecho para determinar las relaciones genéticas a niveles geográficos reducidos o dentro de una misma clase comercial. Dentro del grupo de variedades comerciales de frijol negro liberadas por el INIFAP, sólo algunas han sido recomendadas para el trópico húmedo. Adicionalmente, a nivel de distribución de *P. vulgaris* silvestre en la República Mexicana, es precisamente en las tierras bajas tropicales húmedas y muy cálidas que comprenden el sur de Veracruz, el Estado de Tabasco y este de Campeche, donde no

se reportan accesiones silvestres (Miranda, 1967; López-Soto *et al.*, 2005).

Es posible que los cultivares criollos de frijol negro actualmente utilizados por los agricultores de Tabasco, estén emparentados con los progenitores de las variedades comerciales liberadas por el INIFAP, los cuales se han adaptado a las condiciones locales, tanto ambientales como culturales. Las características morfológicas de estos cultivares criollos no han sido documentadas, por ello el objetivo del presente estudio fue cuantificar el nivel de variabilidad genética presente entre siete cultivares criollos de frijol negro colectados con los agricultores de la región de la Chontalpa, Tabasco y 14 cultivares mejorados de frijol negro, mediante marcadores fenotípicos y de ADN tipo RAPD e ISSR.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Caracterización morfológica

Se hizo en el Ejido Pico de Oro del Municipio de Huimanguillo, Tabasco, que se localiza a 17° 59' L N y 93° 35' L O, en una parcela de 2500 m<sup>2</sup>. El suelo del sitio presentó un contenido de materia orgánica de 2.02 % y un pH de 4.9. El experimento se estableció el 16 de diciembre del 2003, en un diseño experimental de bloques al azar con tres repeticiones. Dentro de cada bloque, los 21 tratamientos (genotipos) fueron distribuidos al azar a una distancia entre surco de 50 cm. La unidad experimental consistió de un surco de 5 m de longitud, con una distancia entre planta de 15 cm. Se depositaron tres semillas por golpe. La población promedio fue de 100 plantas por surco.

Se evaluaron 21 genotipos de frijol común, de los cuales siete fueron variedades mejoradas, siete líneas avanzadas de frijol negro procedentes de la colección del INIFAP-Cotaxtla y siete variedades locales proporcionadas por los agricultores de la región en el año 2002 (Cuadro 1).

Las variables de respuesta evaluadas fueron: altura del tallo a 50 % de antesis (AF), días a floración (desde 50 % de emergencia de plántulas hasta 50 % de antesis, DF), fin de floración (cuando todas las plantas sobre un surco mostraron todas las flores abiertas, FF), inicio de llenado de la vaina (desde 50 % de antesis hasta 90 % de madurez fisiológica de las vainas, ILIV), días a madurez fisiológica (desde 50 % de emergencia de plántulas hasta 90 % de madurez fisiológica, DMF), peso seco de la biomasa aérea (PB), número de vainas por planta (NVP), peso de vainas por planta (PVP), número de semillas por planta (NSP), peso de semillas por planta (PSP), número de semillas por vaina (relación NSP/NVP, NSV), peso de semillas por

Cuadro 1. Variedades mejoradas y criollas de frijol común en Tabasco, sembradas en campo para la evaluación morfológica.

Genotipo	Procedencia	Donador	Raza	HC
1. N. HUASTECO 81	Colección INIFAP	INIFAP, Campo Experimental Cotaxtla	M	Ila
2. NEGRO INIFAP	Colección INIFAP	INIFAP, Campo Experimental Cotaxtla	M	Ila
3. NEGRO OTOMÍ	Colección INIFAP	INIFAP, Campo Experimental Cotaxtla	J	IIla
4. NEGRO TACANÁ	Colección INIFAP	INIFAP, Campo Experimental Cotaxtla	M	Ila
5. JAMAPA	Colección INIFAP	INIFAP, Campo Experimental Cotaxtla	M	Ila
6. ICTA LIGERO	Colección INIFAP	INIFAP, Campo Experimental Cotaxtla	M	Ia
7. NEGRO TICO	Colección INIFAP	INIFAP, Campo Experimental Cotaxtla	M	Ila
8. TLP18	Colección INIFAP	INIFAP, Campo Experimental Cotaxtla	M	Ila
9. TLP22	Colección INIFAP	INIFAP, Campo Experimental Cotaxtla	M	Ila
10. CUT107	Colección INIFAP	INIFAP, Campo Experimental Cotaxtla	M	Ila
11. ICTA JU95-50	Colección INIFAP	INIFAP, Campo Experimental Cotaxtla	M	Ila
12. DOR 667	Colección INIFAP	INIFAP, Campo Experimental Cotaxtla	M	Ila
13. DOR685	Colección INIFAP	INIFAP, Campo Experimental Cotaxtla	M	Ila
14. NEPA 68	Colección INIFAP	INIFAP, Campo Experimental Cotaxtla	M	Ila
15. FRIJOL PONDOY	Paredón 3ª Secc. Huimanguillo, Tab.	Sr. Arnulfo Sigero Urgel		Ilb
16. F. N. C. 2 MESES	Paredón 3ª Secc. Huimanguillo, Tab.	Sr. Arnulfo Sigero Urgel		Ila
17. F. NEGRO C. (16)	Mecoacán, Jalpa de Méndez, Tabasco	Sr. Mateo Hernández Hdez		Ilb
18. F. NEGRO C. (17)	Mecoacán, Jalpa de Méndez, Tabasco	Sr. Francisco Hernández Hdez		Ilb
19. F. NEGRO C. RM	Ejido Zapotal, San Miguel, Hguillo. Tab.	Sr. Reynaldo Martínez M.		Ila
20. F. NEGRO C. RB	Ejido Zapotal, San Miguel, Hguillo. Tab.	Sr. Randolpho Barahona M.		Ila
21. F. NEGRO C. MM	Ejido Zapotal, San Miguel, Hguillo. Tab.	Sra. María E. Méndez Arena		Ila

Razas: M = Mesoamérica; J = Jalisco; HC = Hábito de crecimiento; Ia = Determinado; Ila = Indeterminado erecto de guía corta; Ilb = Indeterminado erecto de guía larga; IIIa = Indeterminado semi arbustivo guía larga.

vaina (a partir de PSP/NVP, PSV), peso individual de la semilla (resultado de PSP/NSP, P1S), proporción de pericarpio ((PVP-PSP)/PVP, PPR), índice de cosecha (100 x PSP/PB, IC). Además, la tasa de crecimiento de la semilla (PSP/ILIV, TCS), tasa de crecimiento de la biomasa (PB/DMF, TCB) y tasa de rendimiento económico (PSP/DMF) (Scully y Wallace, 1990). Para estimar los componentes del rendimiento se tomaron 30 plantas por tratamiento al momento de la cosecha.

### Caracterización molecular

Se seleccionaron 20 semillas de cada genotipo, se colocaron en papel estraza humedecido y enrolladas hasta emergencia de radícula. El ADN fue extraído con el método de CTBA, de acuerdo con Weising *et al.* (2005). Inicialmente se evaluaron 10 iniciadores aleatorios para la técnica RAPD (G-20, G-16, G-18, G-19, G-11, G-15, G-14, G-03, G-17 y G-13) de ROTH Company y 14 iniciadores de microsatélites con y sin ancla para la técnica ISSR (Microsat 1, Microsat 2, Microsat 3, Micro Anch 1, Micro Anch 2, Micro Anch 3, Micro Anch 4, Micro Anch 5, Micro Anch 6, (CA)<sub>8</sub>RT, DBDA(CA)<sub>7</sub>, (GA)<sub>8</sub>YC, (AC)<sub>8</sub>YG y (TCC)<sub>5</sub>RY) sintetizados por SIGMA. Solamente los iniciadores G-19 y G-13 de RAPD y (AC)<sub>8</sub>YG, (GA)<sub>8</sub>YC, (TCC)<sub>5</sub>RY y Micro Anch 6 para ISSR revelaron polimorfismos entre los genotipos en estudio.

Las reacciones de PCR se hicieron por triplicado en eventos independientes, de acuerdo con Valadez y Kahl (2001), en un volumen final de 25 µL. La técnica RAPD se hizo en condiciones severas de Tm (temperatura de alineamiento) para favorecer la reproducibilidad de los análisis

(Valadez *et al.*, 2005). La mezcla de reacción para RAPD consistió de 80 ng µL de ADN genómico, 1.5 U de la enzima *Taq* DNA polimerasa (Applied Bio), 20 pmoles del iniciador, 200 µM de cada dNTP, 2mM de MgCl<sub>2</sub> y amortiguador 1X para *Taq* DNA polimerasa (Promega). El programa de termociclaje consistió de 1 ciclo a 94 °C, 1 min; 38 ciclos [94 °C, 30 s; 40 °C, 30 s; 72 °C, 1.5 min] y 6 min a 72 °C durante 1.5 min. Al final del programa se incluyó un ciclo de extensión a 72 °C (2 min, 30 s). Para los ISSR la mezcla de reacción también se realizó en 25 µL y contenía 50 ng µL de ADN genómico, 1.5 U de la enzima *Taq* DNA polimerasa, 30 pmoles del iniciador, 200 µM de cada dNTP, 3mM de MgCl<sub>2</sub> y amortiguador 1X para *Taq* DNA polimerasa. El programa de termociclaje fue 1 ciclo a 94 °C, 1 min; 38 ciclos [94 °C, 30 s; 48 °C, 30 s; 72 °C, 2.0 min] y 2.5 min de extensión final a 72 °C. Los tubos de reacción tanto de RAPD como de ISSR se cubrieron con una gota de aceite mineral estéril y se colocaron en un termociclador Perkin Elmer 480.

Para los RAPD e ISSR, la separación de los fragmentos amplificados se hizo por electroforesis en geles de agarosa ultrapura a 1.4% con amortiguador TBE 1X (Tris-borato EDTA). Como referencia para estimar el peso molecular de los productos de PCR, se incluyó el marcador de peso molecular de 1 kb (Gibco BRL) en los extremos de cada gel. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (0.5 mg mL<sup>-1</sup> en amortiguador TAE 1X) durante 15 min en oscuridad, después se eliminó el exceso de colorante con agua destilada estéril por 15 min más y se observaron bajo luz UV. Las imágenes se documentaron con una cámara Kodak Digital Science 1D 2.0.

### Análisis de datos

Se hicieron análisis de varianza y pruebas de separación de medias de Tukey para determinar el efecto del genotipo, y las diferencias estadísticas entre cultivares para las variables morfológicas cuantificadas (SAS, 2000). Para conocer la distribución espacial de los genotipos, se hizo un análisis de componentes principales (ACP), con el procedimiento PRINCOMP (SAS, 2000), basado en la matriz de correlaciones y estandarización a la distribución normal de los datos que fue aplicado a los datos morfológicos. Para la construcción de la matriz binaria, los datos morfológicos se codificaron, asignando el dígito 1 a los datos que se encontraban en el rango de la media  $\pm$  desviación estándar y 0 a los que estuvieron fuera de dicho rango. La matriz binaria para los datos moleculares se construyó a partir de las bandas detectadas. Éstas se codificaron, al asignar el dígito 1 a su presencia y 0 a su ausencia.

Para establecer las relaciones de similitud, ambas matrices se sometieron a un análisis de conglomerados de agrupación jerárquica (SAHN) con el método de promedio aritmético de pares no ponderados (UPGMA) del paquete estadístico NTSYS® (Rohlf, 1993). El índice de distancia para el análisis morfológico se calculó mediante distancias euclidianas y para el análisis molecular se utilizó el coeficiente de similitud de Dice (Dice, 1945). La distorsión de los árboles formados se estimó por medio del coeficiente

de correlación cofenética (COPH) a partir de la matriz de similitud. Para los datos morfológicos y los datos conjuntos RAPD-ISSR, se hizo un análisis de remuestreo (Boots-trapping, 1000 repeticiones) a fin de obtener datos numéricos del árbol estadísticamente más robusto con el paquete estadístico Free Tree, que con los datos obtenidos construye los gráficos del árbol con base en distancias euclidianas y de Dice, respectivamente. Las matrices de similitud obtenidas con los datos morfológicos y los moleculares se compararon mediante la prueba de Mantel para conocer la correlación y significancia entre los dos conjuntos de datos.

El porcentaje de loci polimórficos =  $100 \times \text{número de loci polimórficos} / \text{número total de loci}$  (Nei, 1973).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza mostró un efecto genotipo significativo para las variables: altura a floración, días a floración, inicio de llenado de vaina, días a madurez fisiológica, peso seco biomasa aérea, peso de vainas por planta, peso de semillas por planta, número de semillas por vaina, peso de semillas por vaina, proporción de pericarpio, tasa de crecimiento de la semilla y de rendimiento económico. Los cultivares criollos 'Frijol Pondoy', 'Frijol Negro, criollos 16 y 17' y 'Dos meses' presentaron en promedio mayor peso seco de biomasa aérea, peso de semillas por

Cuadro 2. Comparación de medias y cuadrados medios del análisis de varianza para las variables morfológicas que presentaron efecto genético significativo en los 21 genotipos de frijol común evaluados en Tabasco, México.

Genotipo	AFL (cm)	DF (días)	ILIV (días)	DMF (días)	PB (g)	PVP (g)	PSP (g)	NSV	PSV (g)	PPR (g)	TCS (g d <sup>-1</sup> )	TRE (g d <sup>-1</sup> )
N. TICO	15.5 ab	43.0 a	74.0 ab	83.0 abc	26.8 ab	17.0 ab	13.0 abc	4.5 ab	0.89 abc	0.23 ab	0.17ab	0.156 ab
JAMAPA	15.8 ab	43.0 a	73.3 ab	83.3 abc	30.4 ab	20.2 ab	15.1 abc	4.5 ab	0.99 abc	0.25 ab	0.20 ab	0.182 ab
NEPA69	15.6 ab	43.0 a	72.7 ab	83.7 abc	26.6 ab	20.1 ab	15.0 abc	4.4 ab	0.95 abc	0.25 ab	0.20 ab	0.179 ab
ICTAJU95-50	15.8 ab	42.3 a	74.7 ab	86.3 ab	28.3 ab	20.2 ab	14.5 abc	4.1 ab	0.82 bc	0.27 ab	0.19 ab	0.168 ab
DOR685	14.5 ab	41.7 ab	70.7 ab	83.3 abc	18.7 ab	13.9 ab	10.1 bc	4.1ab	0.86 abc	0.27 ab	0.14 ab	0.120 ab
ICTA LIGERO	14.1 ab	39.0 ab	68.7 ab	81.7 bc	19.7 ab	12.9 ab	10.1 bc	4.3 ab	0.94 abc	0.21 ab	0.14 ab	0.123 ab
DOR667	17.3 ab	42.3 a	74.7 ab	85.0 abc	30.9 ab	22.0 ab	16.5 abc	4.3 ab	0.93 abc	0.24 ab	0.22 ab	0.195 ab
N.TACANÁ	16.4 ab	43.0 a	75.3 ab	86.3 ab	24.1 ab	16.8 ab	12.1 abc	3.9 ab	0.79 c	0.27 ab	0.16 ab	0.141 ab
TLP 18	13.1 ab	41.0 ab	76.0 a	85.0 abc	17.3 b	12.4 b	9.8 bc	3.8 ab	0.85 abc	0.21 ab	0.12 b	0.115 b
N. HUASTECO81	16.4 ab	43.0 a	74.0 ab	88.7 a	27.0 ab	17.3 ab	12.6 abc	4.4 ab	1.00 abc	0.26 ab	0.17 ab	0.142 ab
N.OTOMÍ	10.8 b	34.3 b	66.7 b	79.3 c	14.5 b	11.3 b	8.5 c	4.0 ab	0.83 abc	0.23 ab	0.12 b	0.107 b
TLP 22	12.6 b	40.3 ab	70.7 ab	82.7 abc	22.4 ab	15.4 ab	10.7 abc	3.7 b	0.78 c	0.30 a	0.15 ab	0.130 ab
N. INIFAP	22.8 a	43.0 a	75.7 a	87.0 ab	32.7 ab	21.9 ab	15.6 abc	4.4 ab	0.92 abc	0.27 ab	0.20 ab	0.180 ab
CUT 107	14.8 ab	43.0 a	75.3 ab	85.7 abc	30.9 ab	20.6 ab	15.4 abc	4.3 ab	0.84 abc	0.25 ab	0.20 ab	0.181 ab
F. PONDOY	15.7 ab	42.0 ab	77.0 a	87.5 ab	35.6 ab	27.1 ab	22.2 ab	5.1 a	1.10 abc	0.17 b	0.28 ab	0.253 ab
F.N.CRIOLLO (16)	19.3 ab	43.5 a	76.5 a	89.0 a	43.7 a	30.5 a	23.6 a	5.2 a	1.20 ab	0.21 ab	0.30 a	0.263 a
F.N. 2 MESES	17.2 ab	43.0 a	74.7 ab	88.3 a	32.9 ab	21.0 ab	15.9 abc	5.1 a	1.22 a	0.23 ab	0.21 ab	0.181 ab
F. N.CRIOLLO(17)	16.0 ab	43.0 a	73.0 ab	85.0 abc	31.5 ab	22.6 ab	18.8 abc	5.3 a	1.19 ab	0.17 b	0.25 ab	0.221 ab
F.N.CRIOLLO RM	17.0 ab	43.0 a	75.3 ab	87.0 ab	19.1 ab	12.4 b	9.9 bc	4.9 ab	0.97 abc	0.19 ab	0.13 b	0.114 b
F.N.CRIOLLO RB	16.6 ab	43.0 a	75.3 ab	87.0 ab	19.0 ab	12.8 ab	9.9 bc	4.2 ab	0.87 abc	0.22 ab	0.13 b	0.114 b
F.N.CRIOLLO MM	16.8 ab	43.0 a	74.7 ab	87.0 ab	20.3 ab	13.5 ab	10.3 bc	4.5 ab	0.88 abc	0.22 ab	0.13 ab	0.119 ab
Fuente de Variación												
Genotipo	17.04*	12.73**	19.53***	17.69***	133.41**	64.96**	40.66***	0.52***	0.044***	0.0028**	0.0064**	0.0050**
Bloques	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C.V.(%)	19.19	5.74	3.7	2.36	30.49	31.23	29.81	9.97	12.85	15.82	28.8	29.05

AFL = altura a floración; DF = días a floración; ILIV = inicio de llenado de vaina; DMF = días a madurez fisiológica; PB = peso seco biomasa aérea; PVP = peso de vainas por planta; PSP = peso de semillas por planta; NSV = número de semillas por vaina; PSV = peso de semillas por vaina; PPR = proporción de pericarpio por vaina; TCS = tasa de crecimiento de la semilla; TRE = tasa de rendimiento económico. Letras iguales en una columna indican medias estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

planta, número de semillas por vaina, peso de semillas por vaina, tasa de crecimiento de la semilla y menor proporción de pericarpio, respecto a los otros cultivares evaluados (Cuadro 2). El análisis de componentes principales mostró que los tres primeros componentes (CP1, CP2 y CP3) explicaron 80.4 % de la variación total observada. El primer componente contribuyó con 56.98 %, el segundo con 12.85 % y el tercero con 10.58 % de la variación total (Cuadro 3). Las variables de mayor aporte a la construcción del CP1 fueron, en orden descendente: peso seco de biomasa aérea, peso de vainas por planta, número de semillas por planta, peso de semillas por planta, tasa de crecimiento de la semilla y de rendimiento económico. El CP2 asoció las variables: proporción de pericarpio, índice de cosecha, fin de floración, peso de semillas por vaina y días a floración.

Cuadro 3. Valores característicos del análisis de componentes principales y proporción de la varianza explicada con base en la matriz de correlación.

Componente principal	Valor característico	Proporción de varianza	
		Explicada (%)	Acumulada (%)
1	10.82	0.57	0.57
2	2.44	0.13	0.70
3	2.01	0.11	0.80

Generalmente, los genotipos criollos se asociaron con los mejorados. Los criollos 'Frijol Pondoy', 'Frijol Negro, criollos 16 y 17' y 'Dos meses' muestran una estrecha cercanía a nivel espacial, y se localizan en el cuadrante cuyas variables muestran valores altos de peso seco de biomasa aérea y tasa de crecimiento de la semilla y bajos de proporción de pericarpio. No obstante, la distribución espacial de los genotipos (Figura 1) no mostró una definición clara de agrupamientos en el plano de los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2). Diversos estudios para evaluar la diversidad genética basados en características morfológicas se han hecho en frijol común. Al analizar 30 genotipos criollos de frijol común por medio de ACP, Avendaño *et al.* (2002)<sup>1</sup> mostraron que la variación fenotípica estuvo relacionada a los componentes del rendimiento y características fenológicas, y éstas últimas estuvieron asociadas con el hábito de crecimiento. Resultados similares encontraron Rosales *et al.* (2003) al estudiar la diversidad del frijol en México, para las características días a floración e inicio de floración, y señalaron que pueden utilizarse en la evaluación del germoplasma del frijol.

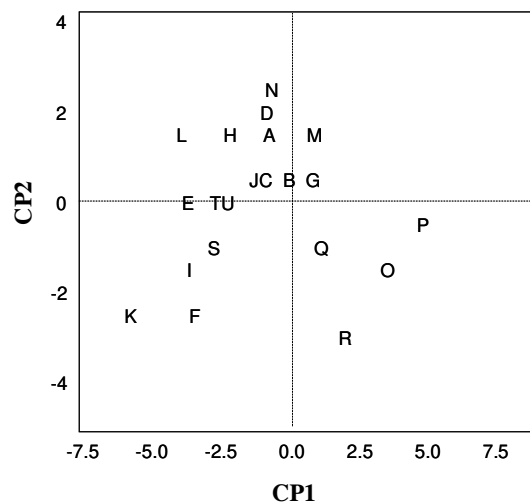


Figura 1. Gráfica bidimensional obtenida mediante el análisis de componentes principales de 21 genotipos de frijol común (A = Negro Tico; B = Jamapa; C = Nepa 69; D = IctaJu 95-50; E = Dor 685; F = Icta Ligero; G = Dor 667; H = Negro Tacaná; I = Tlp18; J = Negro Huasteco 81; K = Negro Otomí; L = Tlp22; M = Negro Inifap; N = Cut 107; O = Frijol Pondoy; P = Frijol Negro Criollo 16; Q = Frijol Negro Criollo 2 meses; R = Frijol Negro Criollo 17; S = Frijol Negro Criollo RM; T = Frijol Negro Criollo RB; U = Frijol Negro Criollo MM).

El grupo de genotipos estudiados pertenece a la misma clase comercial, lo que reduce aún más la variación genética entre los mismos. Aún cuando las variables morfológicas evaluadas son fuertemente influenciadas por el ambiente, los cultivares criollos no mostraron características productivas desfavorables respecto a los mejorados en un ciclo de cultivo. Su evaluación en otros ciclos y ambientes, con la inclusión de otros descriptores de frijol, es necesaria para disminuir el sesgo del ambiente. El análisis de conglomerado jerárquico confirmó la distribución de genotipos observada por el análisis de componentes principales. Los resultados del análisis de remuestreo (1000 repeticiones) indican bajos valores de ajuste entre los posibles agrupamientos (Figura 2).

El estado de Tabasco no se considera una zona de diversidad de frijol en el país; de hecho, en estudios sobre colecciones de germoplasma de la raza Mesoamericana y del grupo de frijoles mexicanos del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), no se mencionan cultivares de los estados de Tabasco, Campeche, Yucatán, y Quintana Roo (Skroch *et al.*, 1998; López-Soto *et al.*, 2005). No obstante, los cultivares de frijol aquí analizados se han utilizado por los agricultores de la Chontalpa, Tabasco, desde hace muchos años y son considerados por ellos como nativos de esa región. El que estos cultivares muestren características morfológicas similares con los mejorados, indica que el proceso de selección empírico ha sido positivo y que ha sido dirigido a características reproductivas, dado los

<sup>1</sup> Avendaño A C H, P Ramírez V, F González H, G Rincón E, S Cruz I (2002) Diversidad de poblaciones nativas de frijol tipo negro: I. Características morfológicas y fisiológicas. In: Memoria del XIX Congreso Nacional de Fitogenética, 1-5 septiembre. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A. C. Saltillo, Coahuila, México. p. 393

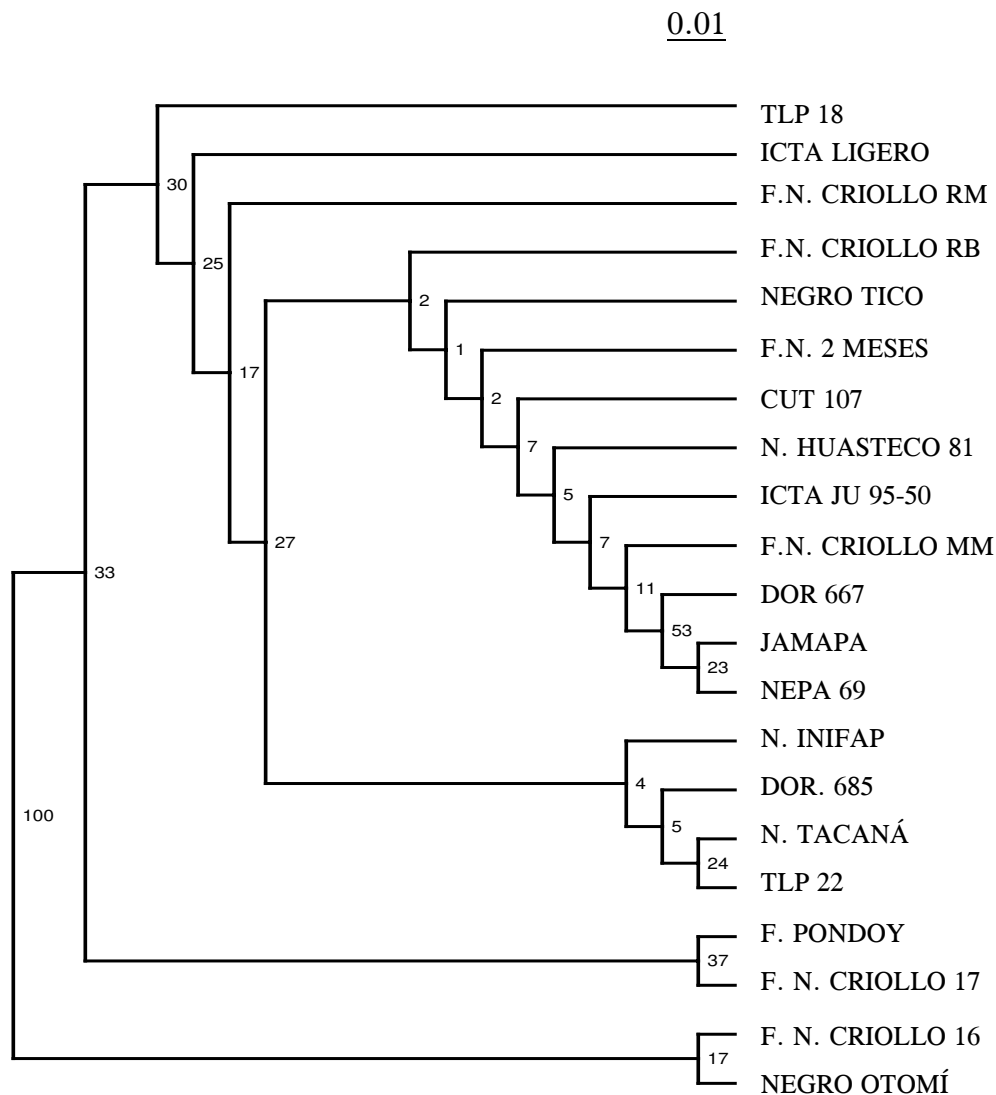


Figura 2. Dendrograma de 19 características morfológicas hecho con el coeficiente de distancias euclidianas y el método de agrupamiento UPGMA. La longitud de la barra corresponde a 0.01 de distancias entre genotipos. Los números en las ramas indican el número de veces en que la topología de una rama particular se repite durante el análisis de robustez del árbol, con base en 1000 remuestreos.

valores PPR, TCS y PB mostrados. Además, se adaptan a las condiciones climáticas del trópico húmedo y a los sistemas de producción de la región, en especial los cultivos 'Frijol Pondoy', 'Frijol Negro criollo 16', y 'Frijol Negro criollo 17'.

#### Caracterización molecular

Los análisis moleculares basados en las técnicas de RAPD e ISSR permitieron estimar la similitud y diferencia genómica entre los genotipos en estudio; y se reprodujeron

siempre los perfiles de ADN de los tres replicados independientes. Además, el incremento de la  $T_m$  utilizada en la PCR (40 °C) en este estudio, permitió la reproducibilidad de los resultados, ya al considerar esta condición, se favorece la detección y amplificación de un producto de PCR particular, debido a la íntima especificidad que se establece entre el iniciador y la zona de alineamiento en el genoma (Valadez *et al.*, 2005).

Los marcadores RAPD se caracterizan por utilizar un solo iniciador de longitud corta a la vez; éste tiene

secuencia arbitraria lo que permite detectar “secuencias complementarias” en el genoma objetivo (De Vienne, 1998). Estudios realizados en frijol común demuestran la utilidad de los marcadores RAPD en los estudios de diversidad genética, por el alto número de fragmentos polimórficos que este tipo de marcador proporciona (Beebe *et al.*, 1995, y 2000; Jacinto *et al.*, 2003; Alzate *et al.*, 2003).

Con RAPD se detectaron un total de 24 bandas, de las cuales 11 fueron polimórficas y 45.8 % se obtuvo con los iniciadores G-19 y G-13 (Cuadro 4). El iniciador G-19 fue el más informativo al detectar 13 bandas de ADN de las que seis fueron polimórficas (46.1 %) mientras que el iniciador G-13 detectó 11 bandas y cinco de éstas polimórficas (45.4 %). El peso molecular de los productos RAPD varió de 250 a 2000 pb. Los iniciadores ISSR seleccionados permitieron revelar mayor polimorfismo entre los genotipos de frijol común estudiados. De un total de 57 bandas detectadas con los 4 iniciadores ISSR, 30 bandas fueron polimórficas (52 %) (Cuadro 4), en donde el iniciador (AC)<sub>8</sub>YG detectó 13/18 bandas polimórficas (72 %), el (TCC)<sub>8</sub>RY 6/13 (46 %), el iniciador Micro Anch 6 detectó 6/14 (42 %) y el iniciador (GA)<sub>8</sub>YC, 5/12 polimorfismos (41 %). El peso molecular de los fragmentos amplificados por estos iniciadores varió de 506 a 1636 pb.

El elemento repetitivo (GATA)<sub>4</sub> y en menor grado (GACA)<sub>4</sub> están bien representados en *P. vulgaris* y *P. lunatus*, mientras que el motivo de dinucleótidos (CA)<sub>8</sub> no lo está en el mismo grado (Hamman *et al.*, 1995). Sobre esta base, el iniciador Micro Anch 6 que contiene las secuencias de motivos GACA produjo buenas amplificaciones y un alto grado de polimorfismo. Estos resultados coinciden también con lo encontrado por González *et al.* (2005) al evaluar la diversidad genética intra y entre poblaciones de frijol de la Sierra Norte de Puebla, donde el iniciador con elemento repetitivo (GACA)<sub>4</sub> produjo el más alto grado de polimorfismo respecto a los otros iniciadores evaluados.

Los niveles de diferenciación revelados por marcadores moleculares en frijol común en México por Rosales *et al.* (2003) y González *et al.* (2005), son más altos que lo reportados en este estudio, debido posiblemente a que los genotipos caracterizados difieren en razas y clases comerciales. Para el estudio de la variabilidad a nivel intraespecífico dentro de una misma clase comercial de frijol común es necesario continuar la búsqueda de marcadores específicos tipo ISSR y complementar la descripción de cultivares criollos con fines de conservación y de protección legal. Aunque la técnica ISSR es muy parecida a la de RAPD, las regiones amplificadas no son aleatorias, ya que las ISSR se mantienen conservadas entre las especies y la variabilidad intraespecífica puede revelarse de manera dirigida (Wolfe *et al.*, 1998).

Esta relación genética se debe a que los iniciadores de núcleos de microsatélites (MP-PCR), que son zonas altamente conservadas en los genomas eucariontes y que permiten este tipos de productos de PCR (ISSR), son capaces de evidenciar mutaciones que afectan la longitud fragmento que está siendo amplificada. De manera que mientras no se aprecien cambios en la longitud del producto, se estima que los organismos que se están comparando son similares, al menos en esa zona del genoma (Weising *et al.*, 2005). Por esta razón es que en este estudio se emplearon ambos tipos de técnicas, una que revelaría similitudes de fragmentos aleatorios y otra que evidenciaría similitudes de fragmentos genómicos conservados. Dada la complementariedad de las características mencionadas, el dendograma molecular fue construido con los datos conjuntos de ambos tipos de marcadores. El análisis de agrupamiento basado en los datos de similitud genética estimada con el coeficiente de Dice (Figura 3) muestra una baja variabilidad entre genotipos. Los resultados del análisis de remuestreo indican bajos valores de ajuste para los posibles agrupamientos.

Cuadro 4. Fragmentos de ADN amplificados y polimorfismos detectados con los iniciadores RAPD e ISSR que diferenciaron genotipos de frijol negro en Tabasco, México

Iniciador	Iniciador	Secuencia 5' → 3'	Número de fragmentos	Fragmentos polimórficos	Polimorfismo (%)
RAPD	ROTHG-19	GTCAGGGCAA	13	6	46.1
	ROTHG-13	CTCTCCGCCA	11	5	45.4
	TOTAL		24	11	45.8
ISSR	(AC) <sub>8</sub> YG	CACACACACACACAYG	18	13	72.0
	(GA) <sub>8</sub> YC	GAGAGAGAGAGAGAYC	12	5	41.0
	(TCC) <sub>8</sub> RY	TCCTCCTCCTCCRY	13	6	46.0
	Micro Anch 6	ACGACAGACAGACAGACA	14	6	42.0
	TOTAL		57	30	52.0

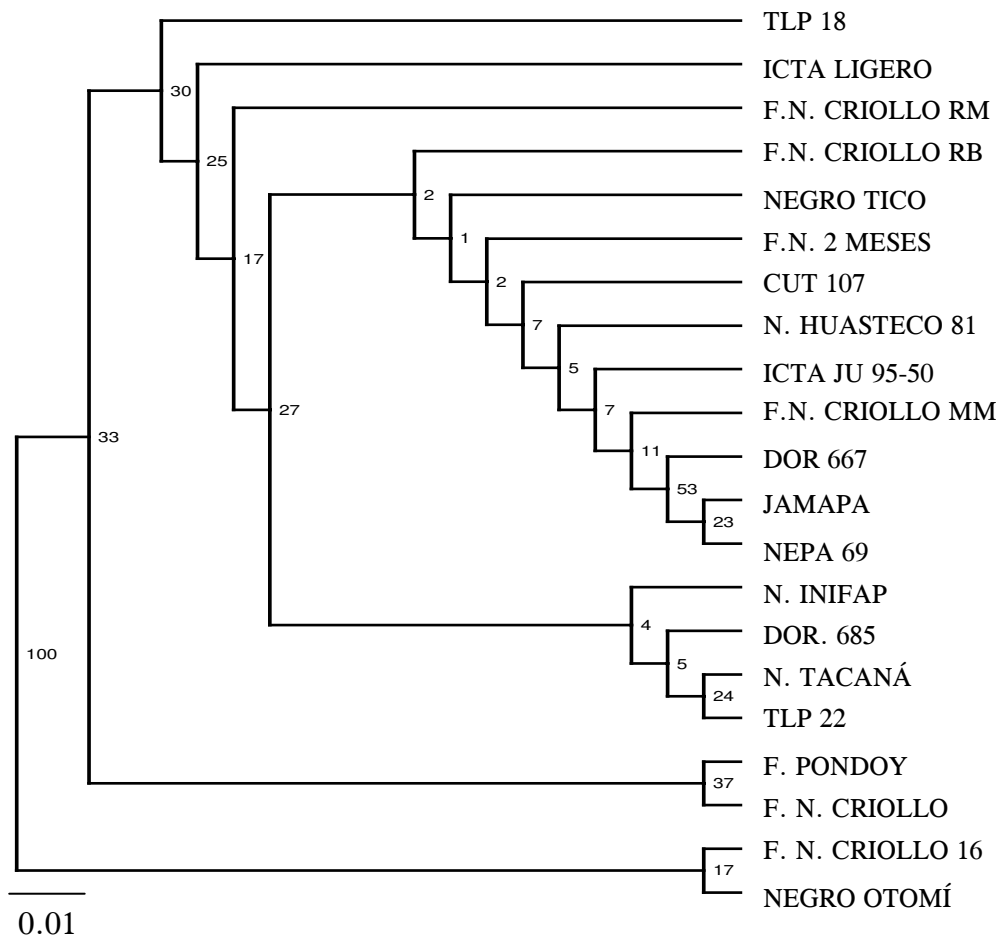


Figura 3. Relación genómica basada en RAPD-ISSR de siete cultivares criollos y 14 mejorados de la Región de la Chontalpa, Tabasco, mediante el coeficiente de Dice y el método de agrupamiento del promedio UPGMA ( $CCC_m = 0.84$ ;  $P \leq 0.001$ ). Los números en las ramas indican el número de veces en que la topología de una rama particular se repite durante el análisis de robustez del árbol, con base en 1000 remuestreos.

Los agrupamientos RAPD-ISSR no mostraron asociación con los de las características morfológicas evaluadas. Esta carencia de asociación fue confirmada por la baja correlación obtenida con la prueba de MANTEL ( $CCC_m = -0.15930$ ) entre las dos matrices de similitud de caracteres morfológicos y de RAPD-ISSR.

### CONCLUSIONES

Estos resultados demuestran que existe una baja variabilidad genética dentro del grupo de genotipos de frijol negro en Tabasco, México. A nivel intraespecífico, el grado de parentesco entre genotipos de *P. vulgaris* es alto, y la diferencia entre ellos es de 6 %. Es de suponer que los

cultivares criollos de la región tienen ancestros en común con las variedades mejoradas o líneas utilizadas en los programas de mejoramiento genético del frijol negro en el país y que han adquirido una adaptación especial a las condiciones húmedas de Tabasco, producto de la selección ejercida por los agricultores de la región.

### AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada al primer autor para la realización de estudios de Maestría y a los Fondos Mixtos CONACYT-Gobierno del Estado de Tabasco por financiar el proyecto TAB-2003-CO3-11645. Al Dr. Xavier M. Boldo por la ayuda en el análisis estadístico de

datos moleculares. Al Ing. Sabel Barrón Freyre (INIFAP-Huimanguillo) y a los agricultores de la Chontalpa por proporcionar el material de frijol evaluado.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alzate M A, C M Regina, A Sartorato, M Peloso, B E Goncalves, M M Alves (2003) Genetic variability and pedigree analysis of brazilian common bean elite genotypes. *Sci. Agri.* 60:283-290.
- Beebe S E, I Ochoa, P Skroch, J Nienhuis, J. Tivang (1995) Genetic diversity among common bean breeding lines developed for Central America. *Crop Sci.* 35:1178-1183.
- Beebe S E, P W Skroch, J Tohme, M C Duque, F Pedraza, J Nienhuis (2000) Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondance analysis of RAPD. *Crop Sci.* 40:264-273.
- Chávez S J L, P Collado, R Pinedo (2003) Conservación ó perdida del valor de las variedades locales de los cultivos amazónicos. *In: Memoria del Seminario Permanente de Investigación Agraria (SEPIA)* X. Pucallpa, Perú. 19-22. Agosto. CODESU, Universidad Nacional de UCAYALI, IBPGRI. Lima, Perú. pp:1-31.
- Degand J, F Vandercam, Q Pierard, M Installé (1994) Analyse du risque lié a l'adoption des systèmes intensifs de production: le cas des camellones chontales. *Cahiers Agric.* 3:31-38.
- Dice L R (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26:297-302.
- De Vienne D (1998) Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. Institut National de la Recherche Agonomique (INRA). París, France. 200 p.
- Gepts P (1998) Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. *Hort. Sci.* 33:1124-1130.
- Gilbert J, R Lewis, M Wilkinson, P. Caligari (1999) Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germoplasm collections. *Theor. Appl. Gen.* 98:1125-1131.
- Gómez O J, M W Blair, L B E Frankow, U Gullberg (2004) Molecular and phenotypic diversity of common bean landraces from Nicaragua. *Crop Sci.* 44:1412-1418.
- González A, A Wong, S A Delgado, R Papa, 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.
- Hamman A, D Zink, W Nagl (1995) Microsatellite fingerprinting in the genus *Phaseolus*. *Genome* 38:507-515.
- Jacinto-Hernández C, S Aspiroz-Rivero, J A Acosta-Gallegos, H Hernández-Sánchez, I Bernal-Lugo (2003) Genetic analysis and random amplified polymorphic DNA markers associated with cooking time in common bean. *Crop Sci.* 43:329-332.
- Katzir N, Y Tadmor, G Tzuri, E Leshzeshen, D N Mozes, P Y Danin, H S Paris (2000) Further ISSR and preliminary SSR analysis of relationships among accessions of *Cucurbita pepo*. *Acta Hort.* (ISHS) 510:433-440.
- López-Soto J L, J A Ruiz C, J J Sánchez G, R Lépiz I (2005) Adaptación climática de 25 especies de frijol silvestre (*Phaseolus* spp) en la república mexicana. *Rev. Fitotec. Mex.* 28:221-230.
- Miranda C S (1967) Origen de *Phaseolus vulgaris* L. (Frijol común). *Agrociencia* 1:99-109.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 70:3321-3323.
- Pérez M J, C R Ferrera, E R García (1994) Diversidad Genética y Patología del Frijol. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Estado de México. pp:2-18.
- Rohlf J F (1993) NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Version 2.02). Exeter Publisher Ptd. Setauket. New York. USA. 157 p.
- Rosales S R, J A Acosta G, R P Duran D, H Guillén A, P Pérez H, G Esquivel E, J S Muruaga M (2003) Diversidad genética del germoplasma mejorado del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México. *Agric. Téc. Méx.* 29:11-24.
- Scully B T, D H Wallace (1990) Variation in and relationship of biomass, growth rate, harvest index, and phenology to yield of common bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115:218-225.
- Skroch P W, J Nienhuis, S Beebe, J Thome, F Pedraza (1998) Comparison of mexican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) core and reserve germplasm collections. *Crop Sci.* 38:488-496.
- Valadez M E, G Kahl (2000) Huellas de ADN en Genomas de Plantas. Teoría y Protocolos de Laboratorios. Ed. Mundiprensa. México. 147 p.
- Valadez M E, G Kahl, J Ramser, B Hüttel, I A Rubluo (2001). Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. *Rev. Fitotec. Mex.* 24:103-120.
- Valadez M E, G Kahl, A Rubluo, R Arreguín-Espinosa (2005) Optimización de las huellas de DNA obtenidas con RAPDs y MP-PCR mediante la técnica RAMPnr. *Rev. Chapingo S. Hort.* 11:351-356.
- Voysest O, M C Valencia, M C Amezcuita (1994) Genetic diversity among Latin American Andean and Mesoamerican common bean cultivars. *Crop Sci.* 34:1100-1110.
- Weising K, H Nybom, K Wolff, G Kahl (2005) DNA Fingerprinting in Plants. Principles, Methods, and Applications. 2nd ed. CRC Press Taylor & Francis Group. USA. 444 p.
- Wolfe A D, Q Y Xiang, S R Kephart (1998) Assessing hybridization in natural populations of Penstemon (Scrophylariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Mol. Ecol.* 7:1107-1125.