

PATRONES DE FASEOLINAS Y ANÁLISIS RAPD EN ESPECIES DOMESTICADAS DE *PHASEOLUS*

PATTERNS OF PHASEOLINS AND RAPD ANALYSIS IN DOMESTICATED SPECIES OF *PHASEOLUS*

Juan Porfirio Legaria Solano

Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5. Carr. México- Texcoco. C.P. 56230 Chapingo, Edo. de México. Fax: 01 (595) 952-1642. Correo electrónico: jlegaria@taurus1.chapingo.mx

RESUMEN

En este estudio se comparó la eficiencia de dos marcadores, uno bioquímico (proteínas faseolinas) y otro genético (RAPD, polimorfismos en el ADN amplificados al azar) para evaluar la diversidad genética y establecer relaciones filogenéticas entre *P. vulgaris*, *P. lunatus* y *P. coccineus*. El análisis de los patrones de faseolinas permitió detectar polimorfismo entre las especies evaluadas, pero no entre variedades de frijol o individuos de una variedad. Las especies más relacionadas, con base en el patrón de faseolinas, son *P. coccineus* y *P. vulgaris*, en comparación con *P. lunatus*. Los RAPD resultaron adecuados para la detección de polimorfismo entre variedades de *P. vulgaris* y entre individuos de *P. coccineus*. El polimorfismo entre cinco individuos de una variedad de *P. coccineus* fue de 24 %, y entre las ocho variedades de *P. vulgaris* fue de 27 %. Los RAPD también permitieron establecer relaciones entre individuos derivados de semillas con color diferente de testa en *P. coccineus*. Los frijoles negros fueron similares a los cafés y los pintos a los blancos, los morados fueron diferentes a los demás. Para *P. vulgaris*, un subgrupo se constituyó por frijoles tipo “Ojo de Cabra”, “Negro Americano”, “Pinto”, “Bayo”, “Garbancillo”, “Negro Bola” y “Peruano”, mientras que “Flor de Mayo” formó un subgrupo aparte. Los resultados concuerdan con la clasificación en razas de los frijoles de México establecida por otros autores. Según esta clasificación y las relaciones genéticas entre cultivares de frijol determinadas en el presente trabajo, “Negro Bola”, “Negro Americano” y “Peruano”, son variedades que están relacionadas con variedades de la raza Durango (“Ojo de Cabra”, “Pinto”, “Bayo” y “Garbancillo”), mientras que “Flor de Mayo” pertenece a la raza Jalisco.

Palabras clave: *Phaseolus spp.*, faseolinas, RAPD.

SUMMARY

In this work we compared the efficiency of two classes of molecular markers, the phaseolin-proteins and the RAPD (random amplified polymorphic DNA) for monitoring the genetic diversity and to establish a phylogenetic relationship among *Phaseolus* species. The analysis of phaseolin patterns was efficient for detecting polymorphism among

Phaseolus species; although it was not efficient for finding differences among cultivars or among individuals within one cultivar. The phaseolin patterns were similar between *P. vulgaris* and *P. coccineus*, and different with *P. lunatus*. The RAPD markers were adequate to detect polymorphism among cultivars of *P. vulgaris* and between individuals of *P. coccineus*. The polymorphism among individuals of *P. coccineus* was 24 %, and 27 % among eight cultivars of *P. vulgaris*. In *P. coccineus* the relationship among individuals derived from seeds of different testa colors were: black seeds were close to brown seeds, white seeds to spotted seeds, and both groups were separated from purple seeds. The cultivars of *P. vulgaris* formed two subgroups separated by an euclidian distance of 2.4. A subgroup was integrated for “Ojo de Cabra”, “Negro Americano”, “Pinto”, “Bayo”, “Garbancillo”, “Negro Bola” and “Peruano”; while “Flor de Mayo” grouped apart. These results agreed with the race classification of Mexican beans established by other authors. According to this classification and our results, “Negro Americano”, “Negro Bola” and “Peruano” are related to cultivars of the Durango race (“Ojo de Cabra”, “Pinto”, “Bayo” and “Garbancillo”), while “Flor de Mayo” belongs to the Jalisco race.

Index words: *Phaseolus spp.*, phaseolins, RAPD.

INTRODUCCIÓN

Generalmente se acepta que el centro de origen del género *Phaseolus* es Mesoamérica, específicamente México y que de este país se dispersaron algunas especies hacia el sur del continente Americano. Este planteamiento responde al hecho de que en México se han identificado 47 de las 52 especies clasificadas del género. El número total de especies no se conoce todavía y según el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, 1980), el género *Phaseolus* incluye aproximadamente 150 especies, de las cuales la mayoría son silvestres y de origen americano.

Según Delgado (Comun. Personal)¹ de ellas cuatro han sido domesticadas: *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus* y *P. acutifolius*. Hay evidencias de que la domesticación del frijol común con cierto tipo de proteínas se llevó en el Occidente de México, específicamente en los estados de Jalisco y Guanajuato (Gepts, 1988; Gepts y Debouck, 1991). El hecho de que 30 % del frijol común que se encuentra en el banco de germoplasma del CIAT es de origen mexicano, demuestra la importancia que tiene México como fuente de diversidad genética de los géneros (CIAT, 1980).

Según Miranda-Colín (1991), *P. vulgaris* predomina en las regiones con altitudes de 1200 m, mientras que *P. coccineus* se ha originado en las tierras templadas o frías en altitudes de 2200 m. *P. lunatus* parece haberse originado en los trópicos, mientras que *P. acutifolius* se originó en las zonas áridas (Byers, 1967).

Los factores que han intervenido en la evolución de *P. vulgaris* y *P. coccineus* han sido el sistema reproductivo (autogamia o alogamia), la migración, la mutación, la selección y la infiltración genética (Miranda-Colín, 1991). En *P. vulgaris* se ha registrado cruzamiento natural en un rango de 1 a 8 % (Barrons, 1938), mientras que en *P. coccineus* es de 73 % (Miranda-Colín, 1991). Además, entre *P. vulgaris* y *P. coccineus* puede haber cruzamiento interespecífico en forma natural (Miranda-Colín, 1967).

Miranda-Colín (1967) indicó que se han efectuado cruzamientos interespecíficos entre *P. vulgaris* x *P. coccineus*, *P. vulgaris* x *P. lunatus* y *P. coccineus* x *P. lunatus*, y que sólo la cruce *P. vulgaris* x *P. coccineus* ha producido híbridos fértiles, mientras que los otros cruzamientos fueron infértiles o sin éxito. Lo anterior da una idea de la existencia de barreras genéticas entre las especies de *Phaseolus* y de las distancias genéticas existentes entre las mismas.

Para caracterizar variedades de frijol tradicionalmente se han utilizado como marcadores a las faseolinas. Estas proteínas de reserva de las semillas de frijol son solubles en soluciones concentradas de NaCl y pueden funcionar como marcadores bioquímicos, lo que permite identificar variedades o especies por sus patrones de bandas específicos. Gepts (1988) detectó diferencias entre los frijoles procedentes de América Central y los de origen Andino; los primeros mostraron faseolinas del tipo "S" y los segundos del tipo "T". Singh *et al.* (1991a,b), con base en un estu-

dio de isoenzimas, sugirió la existencia de tres razas de frijol en México: Durango, Jalisco y Mesoamericana. La raza Mesoamericana se caracteriza por presentar con mayor frecuencia el patrón isoenzimático Me⁹⁸, Durango Me¹⁰² y Jalisco Me¹⁰⁰.

Recientemente se han desarrollado técnicas que permiten la detección de polimorfismo genético a nivel del ADN. Los RAPD o polimorfismos en el ADN amplificados al azar, a diferencia de los marcadores basados en proteínas, proporcionan una forma arbitraria de muestreo del genoma y permiten generar un número ilimitado de *loci* para su uso en el análisis genético (Fritsch y Rieseberg, 1996). Los marcadores RAPD se han utilizado en estudios aplicados y de tipo evolutivo, como la construcción de mapas genéticos, la obtención de marcadores genéticos ligados a caracteres fenotípicos específicos, la determinación de relaciones filogenéticas y de parentesco, y la identificación de clones y variedades, así como para estudios de dinámica de poblaciones (Hadrys *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1993; Whitkus *et al.*, 1994).

Este estudio consistió en establecer relaciones filogenéticas entre las especies domesticadas *P. vulgaris*, *P. lunatus* y *P. coccineus* con base en sus patrones de faseolinas y RAPD, así como detectar polimorfismo para dichos marcadores entre variedades de cada especie y entre los individuos de cada variedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron tres variedades de *P. lunatus* L., dos de *P. coccineus* L. y nueve variedades de *P. vulgaris* L. (Bajo, Ojo de Cabra, Flor de Mayo, Garbancillo, Negro Americano, Negro Bola, Pinto, Negro Jamapa y Peruano) (Hernández-Xolocotzi, 1985). Algunos de los cultivares de *P. vulgaris* se han clasificado en tres razas (Durango, Jalisco y Mesoamericana), según sus patrones isoenzimáticos (Singh *et al.*, 1991a, b) (Cuadro 1).

Las faseolinas se purificaron mediante el método propuesto por Gepts *et al.* (1986), con su solubilización en un amortiguador con NaCl 5M. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida tipo Laemmli, desnaturalizantes (con adición del detergente dodecil sulfato de sodio, SDS). Los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie 0.1 % (p/v), metanol 50 % (v/v) y ácido acético 10 % (v/v); luego se destiñeron con una solución de etanol 5 % (v/v) y ácido acético 7 % (v/v).

¹A Delgado Salinas. 1985. Systematics of the genus *Phaseolus* (Leguminosae) in México and Central America. Ph. D. Thesis. University of Texas. Austin, Texas, USA. pp:1-20.

Cuadro 1. Características de los genotipos de *P. vulgaris* evaluados. Se indica la clasificación por razas, tipo de aloenzima y faseolina que los distinguen, hábito de crecimiento y la región de origen. (Elaborado a partir de datos de Singh et al., 1991a,b).

Cultivar	Raza	Tipo de Aloenzima	Tipo de Faseolina	Hábito de crecimiento	Origen
Ojo de Cabra	Durango	Me ¹⁰²	Sd	Indeterminado III	Zonas áridas del Norte de México
Pinto	Durango	Me ¹⁰²	Sd	Indeterminado III	Zonas áridas del Norte de México
Bayo	Durango	Me ¹⁰²	Sd	Indeterminado III	Zonas áridas del Norte de México
Garbancillo	Durango	Me ¹⁰²	Sd	Indeterminado IV	Zonas áridas del Norte de México
Flor de Mayo	Jalisco	Me ¹⁰⁰	S	Indeterminado III	Zonas altas húmedas del Norte de México
Negro Americano	No definida	No definido	No definida	Determinado	No definido
Negro Bola	No definida	No definido	No definida	Indeterminado	No definido
Peruano	No definida	No definido	No definida	Determinado	No definido
Negro Jamapa	Mesoamérica	Me ⁹⁸	Sb	Indeterminado II	Zonas bajas húmedas de México

M 1 2 3 4 5 6

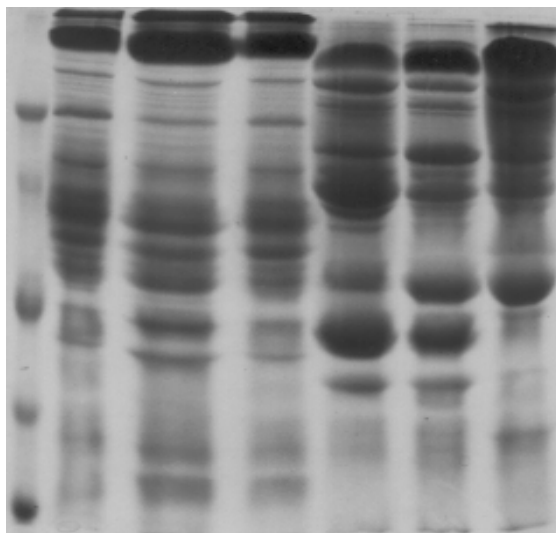


Figura 1. Patrones de faseolinas de diferentes especies de Phaseolus. M = marcador de peso molecular; 1, 2 y 3 = variedades de *P. lunatus*; 4 y 5 = variedades de *P. coccineus*; 6 = variedad de *P. vulgaris* (Negro Jamapa).

Para la obtención de los marcadores RAPD se usaron plántulas desarrolladas en invernadero y cuyo ADN genómico se purificó con el método propuesto por De la Cruz et al. (1997). La concentración del ADN se cuantificó en un espectrofotómetro y se verificó la integridad del mismo luego de realizar electroforesis en un gel de agarosa y teñido con bromuro de etidio, para luego realizar las reacciones en cadena de la ADN polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Se probaron 20 iniciadores decaméricos (OPA01 a OPA20) (Operon Technologies Inc, Alameda, EE.UU.) (Cuadro 2). La mezcla de reacción se realizó en

un volumen total de 25 μL , que incluyó: 4.2 μL de agua bidestilada estéril, 10 μL de dNTPs 500 μM , 2.5 μL de amortiguador 10X, 1.0 μL de MgCl_2 50 mM, 3.0 μL del iniciador a una concentración de 10 pmol, 0.3 μL de enzima *Taq* ADN polimerasa a una concentración de 5U μL^{-1} , y 4.0 μL de ADN genómico a una concentración de 10 ng μL^{-1} . Las condiciones de reacción fueron: un ciclo a 94 °C, 2 min; 38 ciclos a 94 °C, 30 s, 40 °C, por 30 s, 72 °C por 90 s; y al final 72 °C por 2 min.

Los productos se separaron en geles de agarosa a 1.2 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-Base, 5 mM acetato de sodio y 0.77 mM EDTA), durante 3 h a 85 V. Finalmente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 mg mL^{-1}) y se fotografiaron bajo luz UV. Se determinaron los patrones de bandeo, al asignar un valor de 1 a la presencia de una banda y de 0 a la ausencia de la misma. Se calculó una matriz de distancias euclidianas entre los cultivares y con los datos resultantes se hizo un análisis de conglomerados con el método de medias aritméticas (UPGMA, Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average; Sneath y Sokal, 1973), que se representaron en un árbol de relaciones entre los materiales. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa de cómputo STATISTICA 6.0 (Statsoft Inc, Tulsa, OK, EE.UU.). Además, se consideró a los individuos de *P. coccineus* y a los cultivares de *P. vulgaris* como poblaciones, y para estimar parámetros de polimorfismo al nivel de poblaciones, la matriz de datos presencia/ausencia de RAPD se analizó con el programa POPGENE32 (Yeh et al., 1999). Los parámetros de polimorfismo estimados dentro y entre poblaciones fueron: Porcentaje de loci polimórficos (P), número de alelos por locus (A), número efectivo de alelos por locus (Ae), índice de Shannon (S), índice de diversidad genética de Nei (H), coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) y número de individuos migrantes (Nm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectaron diferencias mínimas dentro de los cultivos de la misma especie en el número, intensidad y posición de las bandas que indican los patrones electroforéticos de faseolinas, mientras que entre las especies las diferencias fueron muy amplias (Figura 1). Ello indica que las faseolinas como marcadores bioquímicos, son eficientes para la detección de polimorfismo interespecífico; sin embargo, no detectan polimorfismos entre variedades de la misma especie.

Las especies *P. vulgaris* y *P. coccineus* están más relacionadas entre sí y ambas diferentes a *P. lunatus* en cuanto al patrón electroforético de proteínas (Figura 2). Estos resultados concuerdan con las observaciones de Miranda-Colín (1967), quien realizó cruzamientos entre las tres especies de *Phaseolus* y sólo observó híbridos fértiles en la cruce *P. vulgaris* x *P. coccineus*, lo que indicó que *P. vulgaris* y *P. coccineus* son filogenéticamente más cercanas.

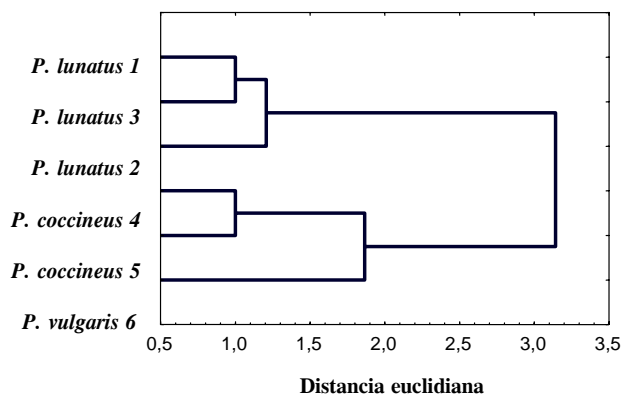


Figura 2. Dendrograma de las distancias euclidianas entre especies de *Phaseolus*. (1, 2 y 3 = variedades de *P. lunatus*; 4 y 5 = variedades de *P. coccineus*; 6 = *P. vulgaris*).

Se encontró poco polimorfismo de faseolinas en las semillas de una variedad de *P. coccineus*, con distintos colores de testa (Figura 3). Esto a pesar de que hay cierto grado de cruzamiento natural entre variedades de una misma especie o entre especies (*P. vulgaris* x *P. coccineus*) (Miranda-Colín, 1991). Entre las variedades de *P. vulgaris* (Figura 4), sólo la variedad Peruano presentó un patrón de faseolinas diferente al resto.

El análisis de los RAPD permitió detectar variabilidad genética entre plantas derivadas de semillas de diferente color en *P. coccineus* y entre variedades de *P. vulgaris* (Figura 5). Ello indica que para la caracterización de variedades de una especie, es mejor utilizar este tipo de mar-

cadores, dado que las faseolinas no permitieron la detección de polimorfismo. Las faseolinas resultaron ser mejores marcadores para la detección de polimorfismo interespecífico. Se observaron bandas comunes para las dos especies, pero también se observaron bandas específicas tanto para *P. coccineus* como para *P. vulgaris*, mismas que podrían servir como marcadores para propósitos de filogenia o de identificación interespecífica (Hadrys *et al.*, 1993). Por ejemplo, en todos los individuos de *P. coccineus* se identificó una banda cercana a los 0.9 kb y en las variedades de *P. vulgaris* se observó una banda de aproximadamente 0.4 kb.

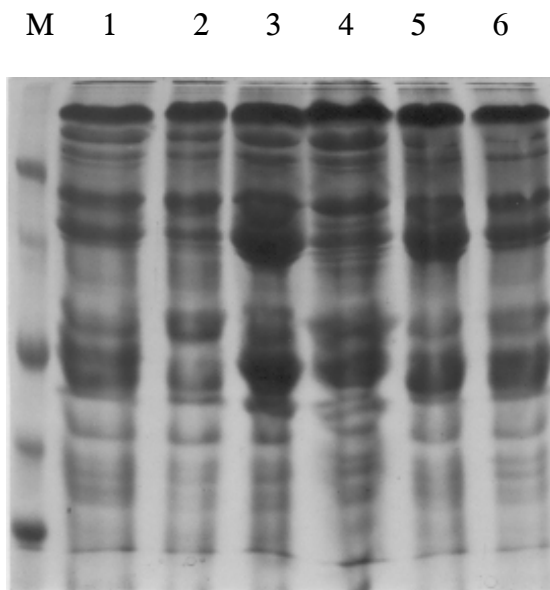


Figura 3. Patrones de faseolinas de semillas individuales de *P. coccineus*. M = marcador de peso molecular. 1 a 6 = Semillas individuales (1 = color blanco; 2 = café; 3 = morado; 4 = morado medio pinto; 5 = morado muy pinto; 6 = negro).

El porcentaje de polimorfismo (P) entre las especies fue de 61 % (Cuadro 3). Dentro de individuos de una variedad de *P. coccineus* se detectó 24 % de polimorfismo, y entre las ocho variedades evaluadas de *P. vulgaris* el polimorfismo fue de 27 % (Cuadro 3). Según Miranda-Colín (1991), en *P. vulgaris* el porcentaje de cruzamiento natural entre variantes cultivadas es alto, lo que junto con la hibridación ejercida por el hombre, puede explicar el polimorfismo genético detectado en *P. vulgaris* L., en comparación con *P. coccineus* L.

El coeficiente de diversidad de Nei (H) (1973) para todos los loci estudiados en las dos poblaciones de frijol (*P. vulgaris* y *P. coccineus*) fue de 0.23 ± 0.21 (Cuadro 3), mientras que para *P. vulgaris* fue de 0.09 ± 0.16 , y para *P. coccineus* de 0.10 ± 0.19 , por lo que las dos especies

resultaron igualmente diversas. El coeficiente de diferenciación de Nei (G_{ST}) fue de 0.60, estimado por partición de la diversidad genética total. Ello indica que aproximadamente 60 % de la variación detectada se debe a diferencias entre las especies. El resto (40 %) representa diversidad genética dentro de las especies. El valor de G_{ST} entre las especies es más alto que la media de G_{ST} (0.23) detectada por Nybom y Barthish (2000) en plantas alógamas, mediante marcadores RAPD. El número de alelos por locus (A) y el número efectivo de alelos por locus (Ae) fue semejante para las dos poblaciones. Con base en la proporción de diversidad total distribuida entre las especies (G_{ST}), se estimó el grado de flujo génico (Nm) cuyo valor fue de 0.32 (Cuadro 3), lo que indica que en promedio ocurre menos de un migrante por generación entre las dos especies, y ello explica su grado de diferenciación.

Varios de los iniciadores probados, como por ejemplo OPA09, no detectaron polimorfismo ya sea entre variedades pertenecientes a la especie *P. vulgaris* o entre las especies *P. coccineus* y *P. vulgaris* (Cuadro 2), tal vez debido a que las especies pudieran estar compartiendo grandes porciones de su genoma (Brown, 2002). Esto indica que ambas especies derivan de un ancestro común o que es el resultado de hibridaciones interespecíficas, o al efecto combinado de ambos mecanismos (Whitkus *et al.*, 1994).

Cuadro 2. Lista de iniciadores y sus secuencias, número de productos amplificados, polimorfismo detectado por especie y polimorfismo total.

Oligonucleótido	Secuencia	Productos amplificados	Polimorfismo por especie (%)		Polimorfismo total (%)
			<i>P. vulgaris</i>	<i>P. coccineus</i>	
OPA01	5'-CAGGCCCTTC-3'	12	33.33	25.00	66.66
OPA02	5'-TGCCGAGCTG-3'	16	37.50	31.25	75.00
OPA03	5'-AGTCAGCCAC-3'	2	0.00	0.00	0.00
OPA04	5'-AATCGGGCTG-3'	3	0.00	0.00	0.00
OPA05	5'-AGGGGTCTTG-3'	19	31.57	63.15	73.68
OPA06	5'-GGTCCCTGAC-3'	No amplificó			
OPA07	5'-GAAACGGGTG-3'	No amplificó			
OPA08	5'-GTGACGTAGG-3'	15	33.33	80.00	80.00
OPA09	5'-GGGTAACGCC-3'	12	0.00	0.00	0.00
OPA10	5'-GTGATCGCAG-3'	15	46.66	40.00	80.00
OPA11	5'-CAATCGCCGT-3'	1	0.00	0.00	0.00
OPA12	5'-TCGGCGATAG-3'	No amplificó			
OPA13	5'-CAGCACCCAC-3'	18	38.88	38.88	77.77
OPA14	5'-TCTGTGCTGG-3'	10	0.00	20.00	30.00
OPA15	5'-TTCCGAACCC-3'	8	62.50	37.50	100.00
OPA16	5'-AGCCAGCGAA-3'	2	0.00	0.00	0.00
OPA17	5'-GACCGCTTGT-3'	1	0.00	0.00	0.00
OPA18	5'-AGGTGACCGT-3'	9	71.42	28.57	77.77
OPA19	5'-CAAACGTCGG-3'	9	11.11	22.22	44.44
OPA20	5'-GTTGCGATCC-3'	8	25.00	12.50	37.50
Promedio		9.41	23.02	23.47	43.69

Cuadro 3. Diversidad genética al nivel de especie en *P. coccineus* y *P. vulgaris*.

	P (%)	A	Ae	S	H	G_{ST}	Nm
<i>P. coccineus</i>	24.39	1.24 (0.43)	1.18 (0.36)	0.14 (0.26)	0.10 (0.19)		
<i>P. vulgaris</i>	26.83	1.26 (0.44)	1.14 (0.29)	0.13 (0.23)	0.09 (0.16)		
Entre poblaciones	60.98	1.60 (0.49)	1.40 (0.40)	0.34 (0.29)	0.23 (0.21)	0.60	0.32

P = porcentaje de loci polimórficos; A = número de alelos por locus; Ae = número efectivo de alelos por locus; S = coeficiente de diversidad de Shannon; H = coeficiente de diversidad de Nei; G_{ST} = coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones; Nm = grado de flujo génico. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar.

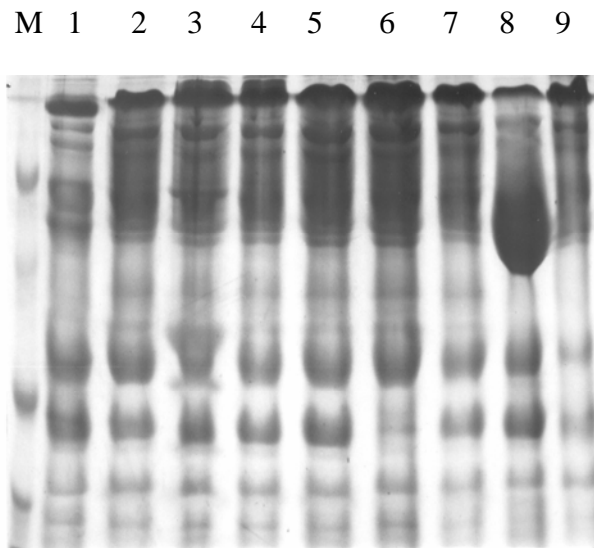


Figura 4. Patrones de faseolinas de semillas de diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris* L. M = marcador de peso molecular; 1 = *Phaseolus coccineus* (testigo); 2 = Bayo; 3 = Ojo de Cabra; 4 = Flor de Mayo; 5 = Garbancillo; 6 = Negro Americano; 7 = Negro Bola; 8 = Peruano; 9 = Pinto.

El dendrograma de la Figura 6 muestra las relaciones entre individuos de *P. coccineus* derivados de semillas de diferente color con diferentes variedades de *P. vulgaris*. Las dos especies formaron dos grupos claramente diferentes a una distancia euclidiana cercana a 4.0. En *P. coccineus*, los frijoles negros fueron más similares a los cafés y los frijoles pintos a los blancos, mientras que los frijoles morados estuvieron más alejados de aquéllos. Las variedades de *P. vulgaris* formaron dos subgrupos a una distancia euclidiana de 2.4 (Figura 6). El primer subgrupo lo integraron las variedades Ojo de Cabra, Negro Americano, Pinto, Bayo, Garbancillo, Negro Bola y Peruano, y el segundo subgrupo lo formó Flor de Mayo.

Singh *et al.* (1991a,b), con base en un estudio de isoenzimas, sugirieron la existencia de tres razas de frijol en México: Durango, Jalisco y Mesoamericana (Cuadro 1). La raza Mesoamericana se caracteriza por presentar con mayor frecuencia el patrón isoenzimático Me⁹⁸, que la Durango Me¹⁰² y la Jalisco Me¹⁰⁰. Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con la clasificación establecida por Singh *et al.* (1991a,b), dado que las variedades incluidas por estos autores en la raza Durango formaron un solo grupo (Ojo de Cabra, Pinto, Bayo y Garbancillo), mientras que Flor de Mayo, de la raza Jalisco se agrupó aparte (Figura 6, Cuadro 1). Las variedades Negro Americano, Negro Bola y Peruano, cuyo origen se desco-

noce, se agruparon con las de la raza Durango, lo que indica que genéticamente están relacionadas con esta raza.

CONCLUSIONES

El análisis de los patrones electroforéticos de las proteínas de reserva de las semillas de frijol, faseolinas, indicó que *P. coccineus* y *P. vulgaris* son más parecidas entre sí y diferentes a *P. lunatus*. Los marcadores RAPD detectaron polimorfismos entre variedades de *P. vulgaris* y entre individuos de *P. coccineus*, y permitieron establecer relaciones entre individuos derivados de semillas con diferente color de testa en *P. coccineus*. Los resultados concuerdan con la clasificación de razas Mexicanas de frijol establecida por otros autores. Las variedades Negro Americano, Negro Bola y Peruano estuvieron relacionadas genéticamente con frijoles de la raza Durango.

BIBLIOGRAFÍA

Barrons K C (1938) Natural crossing in beans at different degrees of isolation. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 36:637-640.

Brown T A (2002) Genomes. Second Ed. Bios Scientific Publisher. New York, USA. pp:483-505.

Byers D S (1967) The Prehistory of Tehuacan Valley. Vol. I. University of Texas. Austin, Texas. USA. pp:1-25.

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (1980) Diversidad Genética de las Especies Cultivadas del Género *Phaseolus*. Guía de Estudio. Cali, Colombia. pp:4-30.

De la Cruz M, F Ramírez, H Hernández (1997) DNA isolation and amplification from cacti. Plant Mol. Biol. Rep. 15:319-325.

Fritsch P, L H Rieseberg (1996) The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: Molecular Genetic Approaches in Conservation. T B Smith, R K Wayne (eds). Oxford University Press. New York, USA. pp:54-73.

Gepts P, T C Osborn, K Rasca, A F 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 (1988) Phaseolin as an evolutionary marker. In: Genetic Resources of *Phaseolus* beans. P Gepts (ed). Kluwer. Dordrecht, The Netherlands. pp:215-241.

Gepts P, D G Debouck (1991) Origin, domestication and evolution of the common bean. In: Common Beans, Research for Crop Improvement. A V Schoonhoven, O Voysest (comps). CAB International. London, England. pp:20-35.

Hadrys H, M Balick, B Scherwater (1993) Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. Mol. Ecol. 1:55-63.

Hernández-Xolocotzi E (1985) Biología Agrícola. CECSA. México. 62 p.

Miranda-Colín S (1967) Infiltración genética entre *Phaseolus coccineus* L. y *Phaseolus vulgaris* L. Colegio de Postgraduados-Escuela Nacional de Agricultura. Serie de Inv.9. Chapingo, México. 48 p.

Miranda-Colín S (1991) Evolución de *Phaseolus vulgaris* y *P. coccineus*. In: Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México. E M Engleman (ed). Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. pp:83-99.

Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70: 3321-3323.

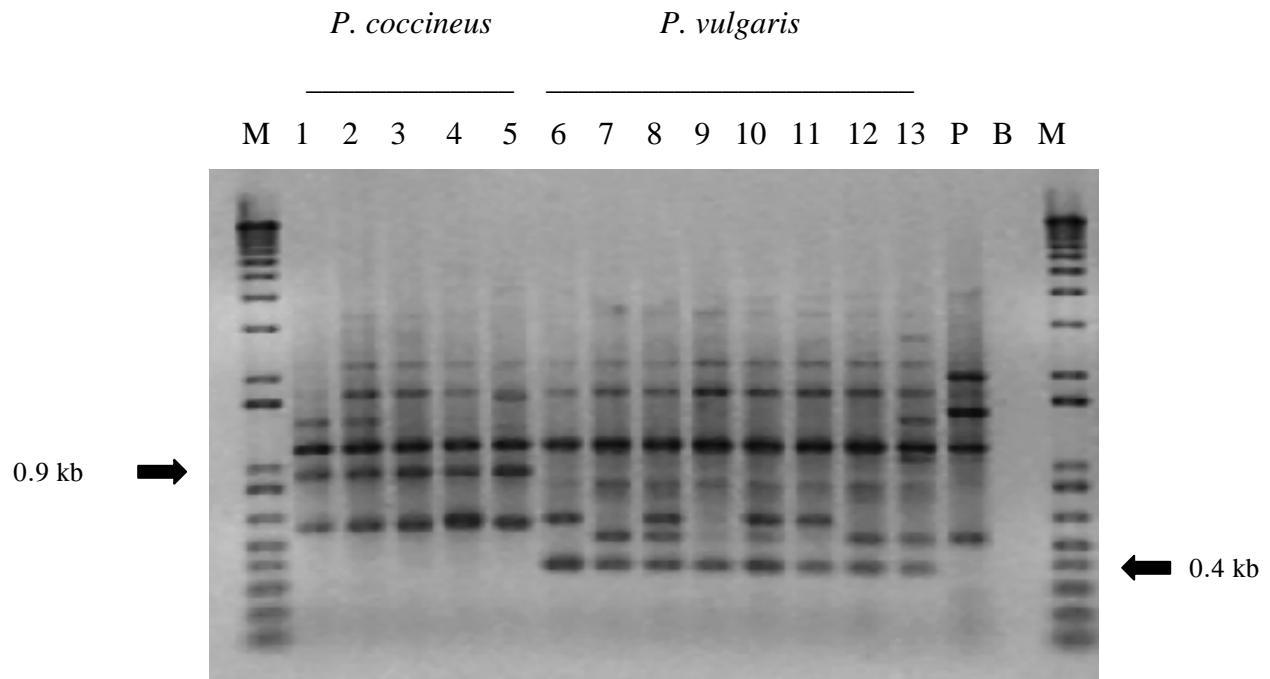


Figura 5. Patrón de productos amplificados RAPD en frijol con semilla de diferentes colores de una variedad de *P. coccineus* y entre ocho variedades de *P. vulgaris*, con base en el iniciador OPA10. M = marcador de peso molecular 1 kb. Semillas de *P. coccineus*: 1 = color negro; 2 = café; 3 = pinto; 4 = morado; 5 = blanco. Cultivares de *P. vulgaris*: 6 = Ojo de Cabra; 7 = Bayo; 8 = Negro Americano; 9 = Pinto; 10 = Garbancillo; 11 = Flor de Mayo; 12 = Negro Bola; 13 = Peruano. P = ADN de pitahaya (*Hylocereus undatus*); B = testigo negativo. Las flechas muestran los marcadores que permiten distinguir a las especies de *Phaseolus*.

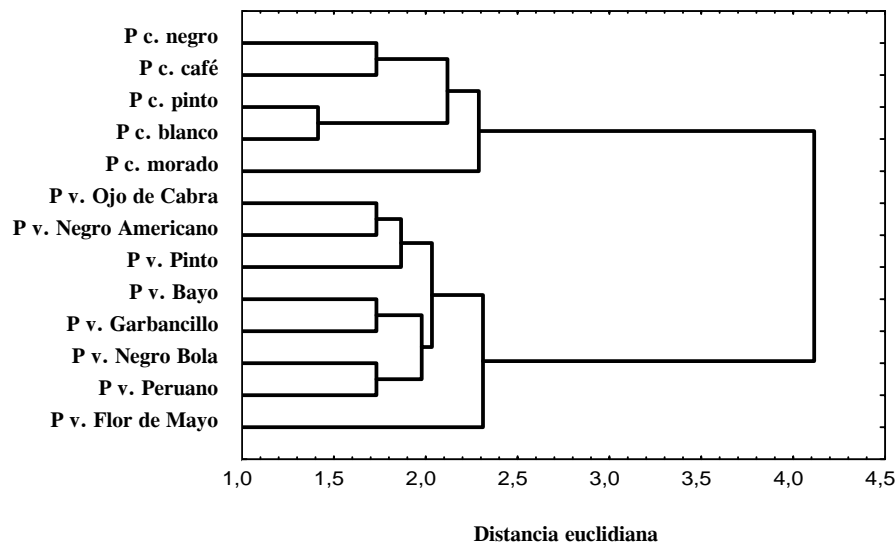


Figura 6. Dendrograma de relaciones genéticas entre especies y variedades de *Phaseolus*. Se muestran las distancias euclidianas obtenidas considerando semillas de diferente color de *P. coccineus* y ocho variedades de *P. vulgaris*.

Nybohm H, I V Bartish (2000) Effects of life history traits and sampling strategies on diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Persp. Plant Ecol. Evol. Syst.* 3:93-114.

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.

Sneath P H A, R R Sokal (1973) Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification. Freeman & Co. San Francisco CA, USA. 573 p.

Statsoft Inc (1998) STATISTICA Versión 6.0. Tulsa, OK, USA.

Whitkus R, J Doebley, J F Wendel (1994) Nuclear DNA markers in systematics and evolution. *In: DNA-based Markers in Plants.* L Phillips, I K Vasil (eds). Kluwer. Amsterdam, The Netherlands. pp:116-141.

Williams J G K, M K Hanafey, J A Rafalski, S V Tingey (1993) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Meth. Enzymol.* 218:704-740.

Yeh F C, R-C Yai, T Boyle (1999) Popgene version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide. Alberta, Canada. 28 p.