

**EVALUACIÓN DEL FLUJO DE GENES EN UN COMPLEJO
SILVESTRE-INTERMEDIO-CULTIVADO DE *Phaseolus lunatus* L.
PARA EL ACERVO MESOAMERICANO**

HAROLD GEOVANNY SUAREZ BARON



**UNIVERSIDAD DEL QUINDIO
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y TECNOLOGIAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA
ARMENIA
2007**

**EVALUACIÓN DEL FLUJO DE GENES EN UN COMPLEJO
SILVESTRE-INTERMEDIO-CULTIVADO DE *Phaseolus lunatus* L.
PARA EL ACERVO MESOAMERICANO**

HAROLD GEOVANNY SUAREZ BARON

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para obtener el título de Biólogo

DIRECTORA

ROSA INES GONZÁLEZ T., M. Sc.

Centro Internacional de Agricultura Tropical
Unidad de Biotecnología

CO-DIRECTORES

DANIEL G. DEBOUCK, Ph.D.

Centro Internacional de Agricultura Tropical
Director Unidad de Recursos Genéticos

VÍCTOR HUGO GARCÍA M., M. Sc

Universidad del Quindío
Programa de Biología

**UNIVERSIDAD DEL QUINDIO
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y TECNOLOGIAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA
ARMENIA
2007**

NOTA DE ACEPTACIÓN

El trabajo de grado titulado “**EVALUACIÓN DEL FLUJO DE GENES EN UN COMPLEJO SILVESTRE-INTERMEDIO-CULTIVADO DE *Phaseolus lunatus* L. PARA EL ACERVO MESOAMERICANO**”, presentado por el estudiante **HAROLD GEOVANNY SUAREZ BARON**, como requisito parcial para optar al título de Biólogo, fue revisado y calificado como:

APROBADO

Rosa Inés González T., M. Sc.
Directora

Dr. Daniel G. Debouck
Co-director

Víctor Hugo García M., M. Sc.
Director Asociado

Armenia, Noviembre 6 de 2007

NOTA DE APROBACIÓN

**Nelsy Loango Chamorro M.Sc.
Jurado**

**Jaime Marín. M. Sc.
Jurado**

**Jorge Enrique Gómez Marín. M.Sc. Ph.D.
Jurado**

Armenia, Noviembre 6 de 2007

*A Dios,
A lo que más quiero y amo en este mundo:
A mis padres, Otilia y José Gabriel,
A mis hermanos, Alfonso,
José Gabriel, Estrella,
Doris, Yanex
y Flor.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial a todas las personas involucradas en el desarrollo de este proyecto; sin el apoyo de ellos no hubiera sido posible su realización.

A Rosita González, por su paciencia, enseñanzas y consejos, su gran cariño, amistad, buen humor y sobre todo gracias por confiar en mí para hacer parte de la gran familia CIAT.

Al Dr. Daniel Debouck (Director de la Unidad de Recursos Genéticos - CIAT), muchísimas gracias por todos sus consejos y enseñanzas, por su valioso tiempo, por su amistad y por darme la oportunidad de hacer parte de su proyecto.

Al Dr. Joe Tohme (Líder del Proyecto de Agrobiodiversidad y Biotecnología – CIAT), agradezco mucho su colaboración y por haberme permitido desarrollar este proyecto en la Unidad de Biotecnología.

Al Biólogo Carlos Andrés Martínez, por su amistad, sus enseñanzas, su constante apoyo y compañía durante las extensas jornadas de trabajo en el laboratorio.

A Myriam Duque, por su gran apoyo en el análisis de datos, por su valioso tiempo y sobre todo por su amabilidad y paciencia para explicar de manera clara la estadística.

A la Bundesministerium für Wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (BMZ) de Alemania por la colaboración económica para la realización de este proyecto.

Al Profesor Víctor Hugo García, por sus consejos, sus enseñanzas genéticas, su colaboración en las correcciones de este trabajo y por su amabilidad y amistad.

Al Profesor Arles López Espinosa, por su gentileza, buenos consejos, su constante colaboración y amistad.

A Samuel Thoraval, de Librophyt (Francia), por su cordialidad y colaboración en el análisis informático.

A César Ocampo y especialmente a Don Antonio Hernández (Laboratorio de Electroforesis – URG), gracias por todo el apoyo técnico, por las palabras de animo, por el buen humor y por las constantes manifestaciones de amistad.

Al equipo de trabajo de producción de semillas – URG y especialmente a Orlando Toro y a Don Héctor por su gran apoyo y colaboración.

Al Dr. Andy Jarvis y a Silvia Castaño de CIAT, por su amabilidad y apoyo con los sistemas de información geográfica.

Al Dr. Álvaro White, por sus consejos y constante apoyo.

A Teresa Sánchez y al equipo de trabajo de CLAYUCA - CIAT, por su gran apoyo técnico.

A Hugo Gomez, Yeicob y Tito, por sus demostraciones de amistad y apoyo.

A todos los profesores del programa de Biología de la Universidad del Quindío y en especial a Nelsy Loango Ch., Andrés Julián Gutiérrez, Rocío García, Carlos A. Agudelo, Roxana Pineda, Yaneth Molina, Freddy Molano, Sandra Coronado, Enrique Arbelaez y Diana Galvis, por sus sabias enseñanzas, amistad y constante apoyo.

A mis amigos y compañeros en el CIAT, Andrés Gutiérrez “Guti” (por su amistad y apoyo), a Yamid Sanabria, Bibiana Maldonado, Eduardo Gorrón, Federico Roda, Diana Bernal, Tatiana Ovalle, Jorge Pachon, Laura Melgarejo, Oscar Estrada, Clarita y Pío, y en general a todos los integrantes de la Unidad de Recursos Genéticos y Biotecnología del CIAT, por su amistad, apoyo y constante colaboración, GRACIAS!

A todos mis amigos de la Universidad del Quindío y especialmente a Lina Maria Londoño, Claudia Marcela Rivera, Jonathan Mauricio Padilla, Cristian Adrián López, Luís Darío Téllez y Diego Román, porque con ellos crecí en conocimientos y sobre todo como persona, por eso mil gracias.

ABREVIATURAS

ACM: Análisis de Correspondencia Múltiple

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados)

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

PIC: *Polymorphic Information Content* (Contenido de Información Polimórfica)

RAPDs: Random Amplified Polymorphic DNA (ADN Polimórfico Amplificado Aleatoriamente)

RFLPs: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción)

SSRs: *Simple Sequence Repeats* (Secuencias Simples Repetidas)

SDS-PAGE: *Sodium dodecyl sulfate - Polyacrilamide gel electrophoresis* (Dodecil sulfato de sodio – Electroforesis en gel de poliacrilamida)

USDA: *United States Department of Agricultura* (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos)

RESUMEN

Las poblaciones naturales no están completamente aisladas, sino que exhiben algún grado de flujo de genes. El flujo de genes es la dispersión activa o pasiva de genes vía semillas, polen o partes clonales de la planta dentro del medio ambiente. En éste estudio se pretende evaluar el flujo de genes dentro del complejo silvestre-intermedio-cultivado de frijol lima, (*Phaseolus lunatus* L.) como resultado de polinización cruzada. Se analizaron 6 poblaciones naturales distribuidas simpátricamente en el estado de Campeche (México), península de Yucatán. Mediante la evaluación de marcadores morfoagronómicos (peso, forma y color de la semilla; hábito; color del hipocotilo), bioquímicos (electroforesis de proteínas y concentración de cianuro en semillas) y moleculares (microsatélites y polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción "RFLP-PCR" en ADN de cloroplasto). Los datos obtenidos permitieron determinar que la población seleccionada como intermedia, correspondiente a posibles formas híbridas, realmente es el producto de eventos de flujo de genes entre poblaciones silvestres y cultivadas, en un 100% de los individuos evaluados. La principal dirección de flujo de genes encontrada, fué del polen de las poblaciones silvestres hacia las formas cultivadas, con un aporte de material genético 1,4 (58%) veces mayor que en el sentido contrario. Estos resultados indican que la dirección del flujo de genes también se presenta desde cultivados hacia sus relativos silvestres (41%), indicando la necesidad de implementar programas de conservación y bioseguridad alimentaria.

Palabras Clave: Flujo de genes, Frijol Lima, *Phaseolus lunatus* L., Acervo mesoamericano, Microsatélites, RFLPs, Proteínas de reserva, Cianuro.

ABSTRACT

Natural populations are not completely isolated, they tend to show some degree of gene flow. Genetic flow is the active or passive dispersion of genes using seeds, pollen or clonal parts of the plant, inside of the environment. This research, it is focus on genes flow inside the wild-weedy-crop complex of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as a result of cross pollinization. This study was analyzed six natural and sympatric populations distributed in Campeche (Mexico) peninsula of Yucatán. Through evaluation morphoagronomic markers (weight, form and seed color; habit and hypocotyl color), biochemistry (proteins electrophoresis and cyanide concentration seeds) and molecular (microsatellites and restriction fragment length polymorphism "RFLP-PCR" in chloroplast DNA). The results allowed to determinate the selected weedy population, it is a possible hybrid form that consist on the product of gene flow events between wild and crop populations in 100% the evaluated individuals. The principal gene flow direction found correspond the pollen of wild population toward crop form, provide genetic material 1,4 (58%) mayor times that in the other way. These results show the gene flow direction also presents crop form towards wild forms relatives (41%), it allows to see the necessity to improve programs of conservation and nutritional biosafety

Keywords: Gene flow, Lima bean, *Phaseolus lunatus* L., Mesoamerican gene pool, microsatellites, RFLPs, Seed storage protein, Cyanide.

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GENERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. MARCO TEORICO	21
3.1 PLANTA MODELO DE ESTUDIO: <i>Phaseolus lunatus</i> L.	21
3.1.1 Taxonomía	21
3.1.2 Descripción botánica	21
3.1.3 Ecología	22
3.1.4 Usos e importancia	23
3.1.5 Características antinutricionales	24
3.2 ACERVOS GÉNICOS DE <i>Phaseolus lunatus</i> L.	25
3.3 FLUJO DE GENES	27
3.3.1 Flujo de Genes en <i>Phaseolus lunatus</i> L.	29
3.5 MARCADORES UTILIZADOS PARA EVALUAR EL FLUJO DE GENES	30
3.5.1 Marcadores Morfoagronómicos	30
3.5.2 Marcadores Bioquímicos	31
3.5.2.1 Electroforesis de proteínas	31
3.5.2.2 Cuantificación de glucósidos cianogénicos	33
3.5.3 Marcadores Moleculares	33
3.5.3.1 Microsatélites o SSR (del ingles “ <i>Simple Sequence Repeats</i> ”)	34
3.5.3.2 Polimorfismo de ADN de cloroplasto	37

4. MATERIALES Y METODOS	39
4.1 ÁREA DE ESTUDIO Y MATERIAL VEGETAL	39
4.2 CLASIFICACIÓN DEL MATERIAL	40
4.3 EVALUACIÓN CON MARCADORES	42
4.3.1 Marcadores morfoagronómicos	42
4.3.2 Marcadores bioquímicos	43
4.3.2.1 Electroforesis de proteínas (PAGE-SDS)	43
4.3.2.2 Cuantificación de Glucósidos cianogénicos por colorimetría	44
4.3.3 Marcadores moleculares	44
4.3.3.1 Extracción y cuantificación de ADN total	44
4.3.3.2 Selección y evaluación de los marcadores microsatélites	45
4.3.3.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida y secuenciación	47
4.3.3.4 RFLP-PCR de ADN de cloroplasto	48
4.4 ANÁLISIS DE DATOS	52
4.4.1 Análisis de correspondencia múltiple (ACM)	52
4.4.2 Evaluación de la dirección del flujo génico	52
5. RESULTADOS Y DISCUSION	53
5.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL COMPLEJO DE <i>P. lunatus</i> L.	53
5.2 CARACTERIZACIÓN MORFOAGRONÓMICA	55
5.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA	60
5.3.1 Patrones protéicos encontrados	60
5.3.2 Concentraciones poblacionales de glucósidos cianogénicos	62
5.4 MARCADORES MOLECULARES	66
5.4.1 Evaluación de polimorfismo de los microsatélites	66
5.4.2 Frecuencias alélicas encontradas	71

5.5 POLIMORFISMO DE ADN DE CLOROPLASTO	71
5.5.1 Haplotipos encontrados	73
5.6 EVIDENCIAS Y DIRECCION DEL FLUJO DE GENES EN <i>P. lunatus</i> L.	75
5.7 CARACTERIZACION DE LOS ACERVOS GENÉTICOS DE <i>P. lunatus</i> L.	81
6. CONCLUSIONES	85
7. RECOMENDACIONES	87
8. BIBLIOGRAFIA	88
ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Composición nutricional de la semilla del frijol Lima (<i>Phaseolus lunatus</i>), en contraste con el frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	23
Tabla 2. Pesos característicos del frijol lima, para sus acervos genéticos y sus respectivas formas silvestres y cultivadas	27
Tabla 3. Principales características de los marcadores moleculares más importantes, con especial referencia a RFLPs y SSRs	38
Tabla 4. Información sobre las colectas del material vegetal	40
Tabla 5. Color de la testa de la semilla de <i>Phaseolus lunatus</i> L.	42
Tabla 6. Regiones de ADN de cloroplasto utilizadas en este estudio	49
Tabla 7. Enzimas de restricción utilizadas para evaluar las regiones del cloroplasto y su respectiva secuencia de reconocimiento	51
Tabla 8. Patrones de lectinas encontrados en las diferentes formas biológicas evaluadas	61
Tabla 9. Concentraciones poblacionales de cianuro obtenidas para cada una de las poblaciones evaluadas, incluyendo los grupos control	65
Tabla 10. Microsatélites escogidos para la evaluación molecular de acuerdo a su índice PIC	67
Tabla 11. Microsatélites utilizados para la evaluación molecular del genoma de <i>Phaseolu lunatus</i> L., para el acervo Mesoamericano	69
Tabla 12. Alelos de microsatélites y frecuencias encontradas en los grupos biológicos	72
Tabla 13. Frecuencia de los haplotipos encontrados en cada una de las formas biológicas evaluadas y en los controles incluidos	74
Tabla 14. Alelos de microsatélites característicos de cada forma biológica dentro del complejo silvestre-intermedio-cultivado de <i>P. lunatus</i> .	78
Tabla 15. Alelos encontrados como exclusivos para cada uno de los acervos genéticos de <i>P. lunatus</i> .	83

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Morfología de <i>Phaseolus lunatus</i> L.	22
Figura 2. Principales zonas de cultivo y consumo de <i>Phaseolus lunatus</i> L., en la región tropical	23
Figura 3. Acervo genético Mesoamericano y Andino de <i>Phaseolus lunatus</i> L.	26
Figura 4. Representación gráfica de un proceso de flujo de genes	28
Figura 5. Flujo de genes intra-específico en un sistema silvestre-intermedio-Cultivado	27
Figura 6. Abeja común (<i>Apis mellifera</i>), polinizando una flor de <i>Phaseolus lunatus</i> L.	30
Figura 7. Reacción de hidrólisis de la linamarina, para la liberación de cianuro	33
Figura 8. Polimorfismo de los microsatélites debido a las diferencias en su longitud	36
Figura 9. Distribución geográfica de los haplotipos de ADN de cloroplasto de formas silvestres de frijol común	38
Figura 10. Area de Estudio. Estado de Campeche	39
Figura 11. Germinación de las semillas y establecimiento de las plántulas en el invernadero de la Unidad de Recursos Genéticos (CIAT)	41
Figura 12. Principales hábitos de crecimiento de las plantas de frijol	43
Figura 13. Sitio de corte de la semilla de <i>Phaseolus lunatus</i> , para el análisis de proteínas	43
Figura 14. Cuantificación de ADN total, en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio	45
Figura 15. Estandarización de las condiciones de amplificación para cada uno de los microsatélites	46
Figura 16. Condiciones estandarizadas para la amplificación para los SSRs	47

Figura 17. Visualización de los microsatélites utilizando el secuenciador automático ABI PRISM 377	48
Figura 18. Localización aproximada de las 11 regiones evaluadas del cloroplasto en <i>Phaseolus lunatus</i> L.	48
Figura 19. Condiciones estandarizadas para la amplificación de las regiones intergénicas de cloroplasto	50
Figura 20. Mapa de la distribución geográfica del complejo silvestre-intermedio-cultivado de <i>Phaseolus lunatus</i> L.	53
Figura 21. Topografía del estado de Campeche, en la península de Yucatán	55
Figura 22. Tamaño de las semillas, determinado por el peso en gramos de 100 semillas	52
Figura 23. Variación del peso de las semillas dentro de cada población y entre grupos biológicos del complejo silvestre-intermedio-cultivado de <i>Phaseolus lunatus</i> L.	58
Figura 24. Colores encontrados en cada uno de los estatus biológicos del complejo y en los controles utilizados	59
Figura 25. Formas de la semilla encontradas para cada unos de los estatus biológicos de <i>Phaseolus lunatus</i> L.	59
Figura 26. Patrones electroforéticos de lectinas encontrados dentro del complejo silvestre-intermedio-cultivado de <i>Phaseolus lunatus</i> L.	60
Figura 27. Concentraciones de cianuro encontradas para cada uno de los grupos biológicos dentro del complejo silvestre-intermedio-cultivado de <i>Phaseolus lunatus</i> L.	64
Figura 28. Dendrograma de todos los individuos de incluidos en este estudio, con base en los resultados obtenidos de 19 microsatélites usando en método UPGMA a partir de similaridad	70
Figura 29. Haplotipos encontrados para <i>Phaseolus lunatus</i> , mediante el análisis de ADN de cloroplasto	74
Figura 30. Distribución espacial de los individuos obtenida mediante el análisis de correspondencia múltiple	77
Figura 31. Representación gráfica de 16 individuos con características Intermedias	79

Figura 32. Gráfica de ACM donde se muestra la distribución de los individuos de <i>P. lunatus</i> de los dos acervos.	82
Figura 33. Comparación morfológica entre los complejos evaluados para cada acervo	81
Figura 34. Patrones de proteínas obtenidos para los acervos Mesoamericano y Andino	83
Figura 35. Analisis de ACM donde se muestra la distribución de la población G25943 con respecto a los acervos Mesoamericano	84

LISTA DE ANEXOS

	Página
ANEXO A: Datos de pasaporte de los individuos de <i>Phaseolus lunatus</i> incluidos en este estudio.	97
ANEXO B: Método de extracción de proteínas de semilla en frijol	102
ANEXO C: Protocolo para la extracción de ADN total	104
ANEXO D: Preparación del gel de agarosa (1 %; 1,5 %)	105
ANEXO E: Microsatélites evaluados para determinar los más polimórficos en <i>Phaseolus lunatus</i> L.	106
ANEXO F: Preparación del gel de poliacrilamida y tinción con plata	108
ANEXO G: Resultados obtenidos en la evaluación inicial de 68 marcadores microsatélites para <i>Phaseolus lunatus</i> L.	110
ANEXO H: Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de las poblaciones cultivadas de <i>P. lunatus</i> del acervo Mesoamericano	112

INTRODUCCIÓN

Generalmente las poblaciones naturales no están completamente aisladas, sino que exhiben algún grado de flujo de genes (Futuyma, 1998). El flujo de genes es la dispersión activa o pasiva de genes, vía semillas, polen o partes clonales de la planta dentro del medio ambiente (Bartsch *et al*, 2002). Razón por la cual el flujo de genes se puede entender como el movimiento natural de material genético de una población o subdivisiones de una población a otra (Hamrick *et al*, 1995).

Este flujo de genes dentro y entre poblaciones, es uno de los principales factores que determinan los patrones de variación genética en las poblaciones (Hardy *et al*, 1997). Además, ésta transferencia de material genético está asociada con algunos riesgos ecológicos para las poblaciones silvestres, criollas y cultivadas como: la tendencia a homogenizar la estructura de las poblaciones (Ellstrand *et al*, 1999) y la introgresión de transgenes desde cultivos genéticamente modificados a sus relativos silvestres (Stewart. Jr, *et al*, 2003), en relación con la siembra simpátrica de cultivos transgénicos (Gepts y Papa, 2003)

El género *Phaseolus* comprende alrededor de 50 especies (Debouck, 1988), siendo las especies *Phaseolus vulgaris* L. (fríjol común), *Phaseolus coccineus* L., *Phaseolus acutifolius* A. Gray, y *Phaseolus lunatus* L. (fríjol lima), las más representativas del genero.

El fríjol lima (*Phaseolus lunatus* L.) es una de las mayores especies cultivadas del género *Phaseolus*, y es una significativa fuente de proteínas para las poblaciones rurales de América y África (Lioi y Galasso, 1998), pero no es tan difundido como el fríjol común, *Phaseolus vulgaris* L. (Arango, 1997), principalmente por el alto contenido de glucósidos cianogénicos que pueden llegar a desarrollar algunas variedades de ésta especie (Baudoin *et al*, 1991).

La especie *Phaseolus lunatus* es un modelo de estudio bastante interesante debido a diferentes aspectos fenológicos, fisiológicos y bioquímicos, así como por la gran diversidad génica que exhibe y sus altos niveles nutricionales, a lo que se suma su amplio rango de distribución geográfica. El frijol lima posee características de interés agronómico, como la resistencia a diferentes plagas, permanente producción de semillas y su alta tolerancia a la sequía. *Phaseolus lunatus* es una especie anual o de corta vida perenne, con un sistema de reproducción mixto que es predominantemente autógeno, pero con casos estudiados de alogamia que indican una variación de entre menos de 1% y el 10%, debido principalmente a la fenología floral que posibilita eventos de polinización cruzada (Webster et al, 1979). En otros estudios se han reportado niveles de alogamia hasta del 48% (Baudoin et al, 1998) permitiendo la formación de complejos que incluyen los tipos silvestres, intermedios y cultivados (Debouck et al, 1987)

Un aspecto importante y que va de la mano con el fenómeno de flujo de genes es la presencia en *Phaseolus lunatus* de glucósidos cianogénicos, que pueden llegar a ser tóxicos y que han sido reportados principalmente en poblaciones silvestres por Baudoin et al, (1991). La asociación de esta característica con posibles eventos de flujo génico, puede ser de gran utilidad para evaluar y monitorear los cambios en las concentraciones de estos compuestos y sus efectos desfavorables para los consumidores, así, como el impacto que dicha variación podría tener en los agroecosistemas tradicionales de diferentes grupos indígenas de la península de Yucatán, como es el caso de los Mayas.

El presente trabajo tiene como objetivo evidenciar, si la población evaluada como intermedia (posibles híbridos) es el resultado de eventos de flujo de genes, dentro del complejo silvestre-intermedio-cultivado de *Phaseolus lunatus* L. Así, como determinar cuál es la dirección de dicho flujo génico y cuál es la variación respecto al contenido de cianuro dentro del complejo de *P. lunatus* L., para lo cual se utilizaron marcadores morfoagronómicos (peso, color, hábito, color del hipocotilo, forma y tamaño de la semilla), bioquímicos (análisis de lectinas y cuantificación de cianuro en semillas) y moleculares (microsatélites y polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción "RFLP-PCR" en ADN de cloroplasto)

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la existencia de flujo de genes dentro del complejo silvestre-intermedio-cultivado de *Phaseolus lunatus* L., perteneciente al acervo genético Mesoamericano, mediante marcadores morfoagronómicos, bioquímicos y moleculares.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evidenciar que los individuos determinados como intermedios son el resultado de eventos de flujo de genes dentro del complejo silvestre-intermedio-cultivado de *Phaseolus lunatus* L., en poblaciones del acervo genético Mesoamericano.
- Determinar la dirección del flujo de genes en el complejo evaluado de *Phaseolus lunatus* L.
- Establecer los niveles de glucosidos cianogénicos a nivel poblacional, dentro del complejo silvestre-intermedio-cultivado de *Phaseolus lunatus* L., y su relación con el fenómeno de flujo de genes.

3. MARCO TEORICO

3.1 PLANTA MODELO DE ESTUDIO: *Phaseolus lunatus* L.

3.1.1 Taxonomía

La especie *Phaseolus lunatus* L, presenta la siguiente ubicación taxonómica, según la red de información sobre recursos de germoplasma (GRIN del inglés “*Germplasm Resources Information Network*”) del departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA del inglés “*United States Department of Agriculture*”):

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Faboideae

Tribu: Phaseoleae

Género: *Phaseolus*

Especie: *Phaseolus lunatus* L.

3.1.2 Descripción botánica

El frijol lima (*Phaseolus lunatus*) es una planta herbácea perenne o anual, con un tipo de germinación epigeal (Summerfield y Roberts, 1985) la cual muestra una considerable variación en la forma de sus vainas y semillas, como resultado de su hibridización en campo. Su hábito es de tipo enredadera, usualmente de 1.8 a 4 m de altura (Figura 1A). La inflorescencia es un racimo axilar, de aproximadamente 15 cm de longitud llevando

numerosas flores (hasta cuatro por nudo), de color blanco (Figura 1C). Las vainas son oblongas, generalmente curvadas con forma de pico, con una longitud aproximada de 5-12 cm. y un ancho de 1.5-2.5 cm, algo pubescente de 2 a 6 semillas (Figura 1B), presentándose mucha variabilidad en tamaño, forma y color (Kay, 1979).

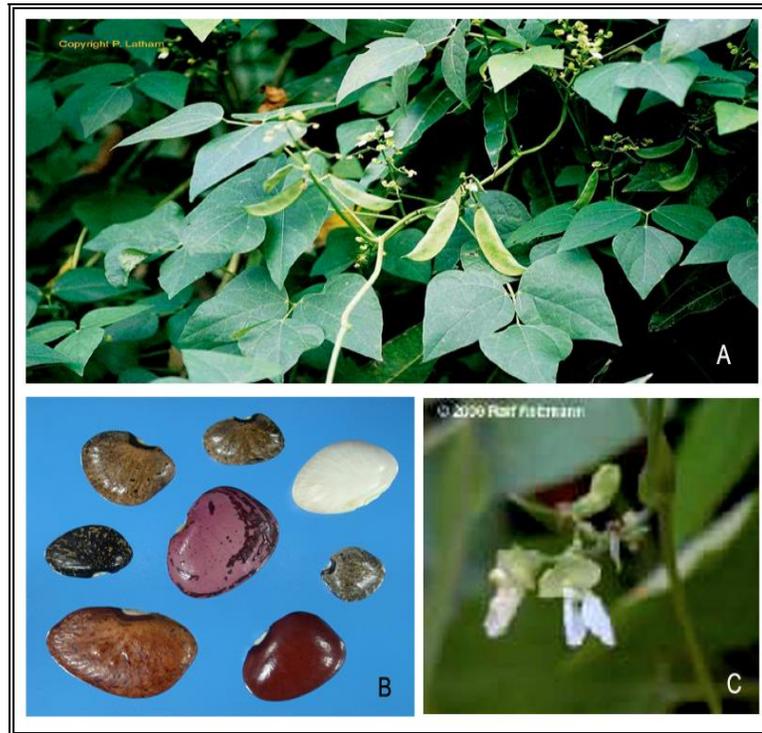


Figura 1. Morfología de *Phaseolus lunatus* A: *Habito* Fuente; <http://Home.tiscali.be//pauwels/Latham2.htm>. B. Semillas. C. Inflorescencia (Fuente: <http://www.hrt.msu.edu>).

3.1.3 Ecología

El frijol lima es cultivado preferiblemente en suelos bien aireados, suficientemente drenados y con un pH de entre 6 – 6.8 (Baudoin, 1991), encontrándose desde las tierras bajas húmedas de los trópicos hasta las estepas y en regiones de temperaturas calurosas. Estos son encontrados desde el nivel del mar a los 2000 metros de altitud y florece en regiones con una temperatura media mensual que oscila entre 16 y 27° centígrados, y su tolerancia respecto a la precipitación anual se encuentra como entre los 500 y los 1500 mm (Summerfield y Roberts, 1985).

3.1.4 Usos e importancia

El frijol lima es un componente importante de la dieta en muchas regiones tropicales (Figura 2), debido a que su composición química es parecida a la de muchas otras leguminosas (Summerfield y Roberts, 1985).

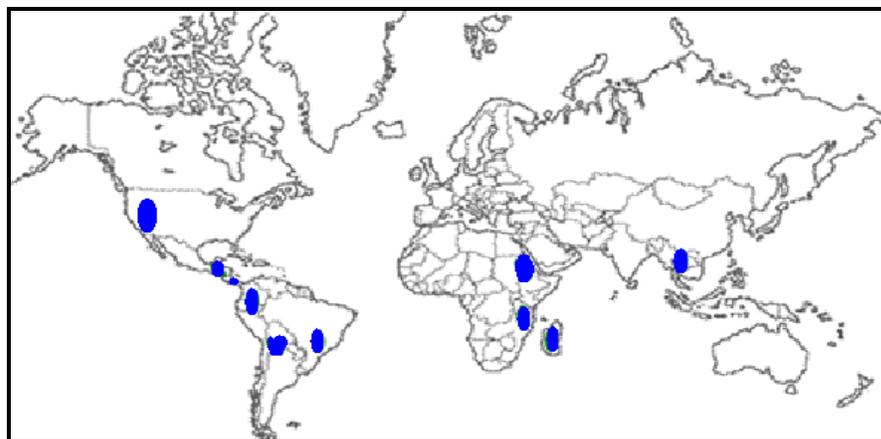


Figura 2. Principales zonas de cultivo y consumo de *Phaseolus lunatus* L., en la región tropical.

Las propiedades nutricionales de *P. lunatus* son muy similares a las del frijol común (Tabla 1). Sólo el porcentaje de proteína cruda es un poco más elevado en el caso de *P. lunatus*. Por otra parte, de los nueve aminoácidos esenciales que contiene ambas especies, el frijol común (*P. vulgaris*) presenta valores ligeramente superiores en siete de ellos; en Triptofano y Cisteína es superior (Domínguez *et al*, 2002).

Tabla 1. Composición nutricional de la semilla del frijol Lima (*Phaseolus lunatus*), en contraste con el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) (Fuente: Domínguez *et al.*, 2002).

Componente (%)	<i>Phaseolus lunatus</i> L.	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Proteína cruda	7.2 – 32.1	16.0 – 28.2
Triptófano	1,2	0,8
Cisteína	1,2	0,8
Grasa	0.5 – 3.2	0.8 – 2.3
Carbohidratos	49.4 – 66.0	40.1 – 62.4
Fibra cruda	3.0 – 6.0	2.0 – 5.6
Ceniza	2.7 – 4.5	2.8 – 6.3
Agua	6.0 – 13.2	7.7 – 14.6

Algunas características antinutricionales o tóxicas han sido encontradas en algunas variedades de ésta especie, incluyendo inhibidores de proteasas, fitohemoaglutininas o lectinas y cianogénicos (Summerfield y Roberts, 1985). Estos componentes antimetabólicos pueden disminuirse o eliminarse mediante un buen tratamiento de las semillas antes de su consumo.

La producción de frijol lima es considerablemente alta en Estados Unidos, alcanzando las 39.520 toneladas en el año 2005 (USDA, 2006). En este país se consume en diferentes presentaciones (semillas frescas y productos procesados), al igual que en Sur y Centro América, y en las tierras bajas húmedas de África. En Asia se utilizan como alimento (las plántulas o las hojas tiernas) y en medicina tradicional (Summerfield y Roberts, 1985). Las cosechas de ésta especie tienen un significativo valor cultural principalmente en Centro América, por su extendido uso en el sistema tradicional de cultivo mesoamericano “*la milpa*”, que consiste en la siembra conjunta de maíz y frijol (*Phaseolus lunatus*). Además de otros usos como la preparación de heno (en Madagascar) y su utilización como juguetes por muchas comunidades campesinas del Centro y Sur América, debido a su alto valor estético, que se relaciona con la gran diversidad de colores y tamaños que exhiben las semillas (Domínguez *et al*, 2002).

3.1.5 Características antinutricionales

Una de las características que tiene el frijol lima, es la presencia de glucósidos cianogénicos (linamarinas o faseolunatinas) (Baudoin *et al*, 1991), lo que puede llegar a generar en sus consumidores, efectos nocivos, derivados de la inadecuada preparación de las semillas. Los contenidos más altos de éstos glucósidos se han encontrado en poblaciones silvestres (entre 853 y 4.385 ppm) (Baudoin *et al*, 1989). En poblaciones cultivadas se han obtenido valores de cianuro relativamente bajos (entre 5 y 1.058 ppm) (Baudoin *et al*, 1989), éstas cantidades reportadas en poblaciones cultivadas pueden llegar a ser altamente tóxicas para el ser humano, ya que los valores máximos permitidos para su consumo en alimentos son de 100 ppm (CLAYUCA, 2001). Para poblaciones intermedias, también se han reportado niveles de cianuro (con un promedio de 1.735 ppm, para 4 poblaciones) (Baudoin *et al*, 1989), pero hasta ahora no se había relacionado esta característica con fenómenos de flujo génico.

3.2. ACERVOS GÉNICOS DE *Phaseolus lunatus* L.

Un acervo genético incluye una parte de la variabilidad genética total, a manera de genotipos que comparten ciertas características comunes.

Los acervos genéticos están organizados de tal manera, que un acervo primario incluiría a los individuos que pueden cruzarse de manera sencilla, dando como resultado otros individuos viables. Un acervo genético secundario está compuesto por individuos que pueden llegar a cruzarse con individuos del acervo primario, terminando en la obtención de individuos viables. Tanto los acervos genéticos terciarios como los cuaternarios, presentan limitaciones a la hora de cruzarse con individuos de especies relacionadas de los acervos primarios o secundarios.

La diversidad dentro de las especies del género *Phaseolus* en relación al frijol común, *Phaseolus vulgaris*, está organizada dentro de acervos de genes primarios, secundarios, terciarios y cuaternarios (Debouck, 1999). El pool primario de genes compromete poblaciones cultivadas y silvestres, el pool secundario de genes de frijol común incluye, *P. coccineus*, *P. costaricensis*, *P. albescens* y *P. dumosus*. El acervo de genes terciario estaría compuesto por *P. acutifolius* y *P. parvifolius*, mientras que, *P. filiformis* y *P. Angustissimus* con *P. lunatus*, podrían ser considerados un pool de genes cuaternario del frijol común (Debouck, 1999).

Para el caso de *P. lunatus*, el “pool” primario de genes estaría caracterizado por un alto nivel de diversidad genética, e incluiría formas cultivadas y domesticadas (Baudet, 1977). Los estudios de variación genética y relaciones entre cultivos y poblaciones silvestres (basados en marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares), han sugerido la existencia de dos acervos de genes mayores (Figura 3): acervo genético Mesoamericano y acervo genético Andino y un grupo de genotipos intermedios menores (Caicedo *et al*, 1999; Debouck *et al*, 1987; Lioi *et al*, 1998; Lioi y Galasso, 2002).

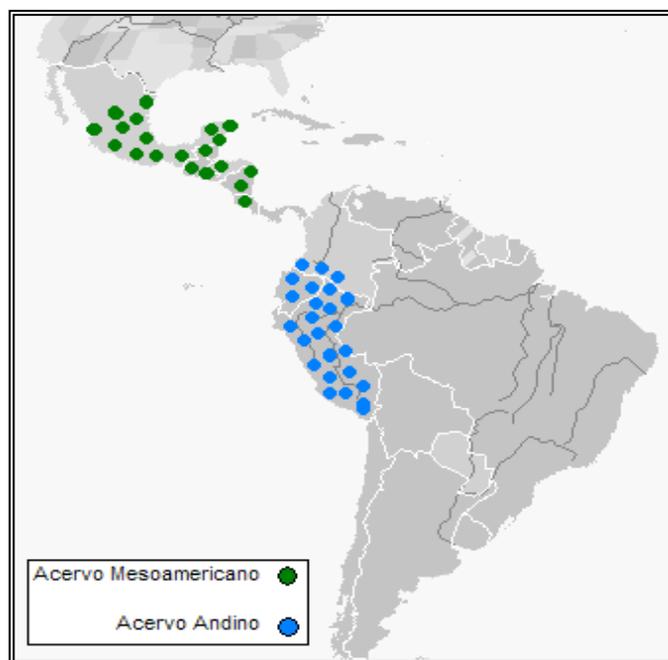


Figura 3. Acervo genético Mesoamericano (círculos verdes) y Andino (círculos azules) de *Phaseolus lunatus* L.

La distribución del acervo Mesoamericano, va desde Sinaloa (México) hasta Salta (Argentina), encontrándose por debajo de los 1.600 msnm. Este acervo se caracteriza por presentar semillas de tamaños pequeños en comparación con las del acervo Andino, con semillas de menos de 14 g/100 semillas en silvestres y 24-70 g/100 semillas para las formas cultivadas (Tabla 2) (Debouck *et al*, 1989; Gutierrez-Salgado *et al*, 1995; Arango, 1997). El acervo Andino se encuentra distribuido en Colombia, Ecuador y norte de Perú para las poblaciones silvestres. Las formas cultivadas incluyen el sur de Colombia, Ecuador, centro y costa de Perú, Bolivia y Brasil. Incluyendo semillas con tamaños mayores a 14 g/100 semillas en las formas silvestres y entre 54-100 g/100 para las poblaciones cultivadas (Tabla 2) (Gutierrez-Salgado *et al*, 1995; Arango, 1997).

El acervo mesoamericano y en especial las poblaciones presentes en la península de Yucatán, han sido estudiadas con accesiones incluídas en bancos de germoplasma sobre la base de caracteres morfológicos y enfocándose esencialmente en el pool de genes domesticado (Martínez-Castillo *et al*, 2006), indicando una alta diversidad genética para éste pool (Debouck, 1979), además, la península de Yucatán, hace parte del área de domesticación del pool de genes mesoamericano de *P. lunatus* (Gutierrez-Salgado *et al*, 1995).

Tabla 2. Pesos característicos del frijol lima, para sus acervos genéticos y sus respectivas formas silvestres y cultivadas.

ACERVO GENETICO	SILVESTRE	CULTIVADO
Andino	≥ 14 g/100 semillas	Gran Lima:54-280 g/100 semillas
Mesoamericano	≤ 14 g/100 semillas	Sieva: 24-70 g/100 semillas Potato: 24-53 g/100 semillas

3.3. FLUJO DE GENES

Se puede entender el flujo de genes como la incorporación de genes (Figura 5) dentro del “pool” de genes de una población desde una o más poblaciones (Futuyma, 1998).

Para que el flujo de genes tenga lugar entre las poblaciones cultivadas y sus parientes silvestres (Figura 4), se deben cumplir varias condiciones, incluyendo: i) la presencia de formas cultivadas y silvestres dentro de los rangos de dispersión de pólen o semillas, ii) la habilidad de producir híbridos viables y iii) al menos un solapamiento parcial en el tiempo de floración (Gepts y Papa, 2003).

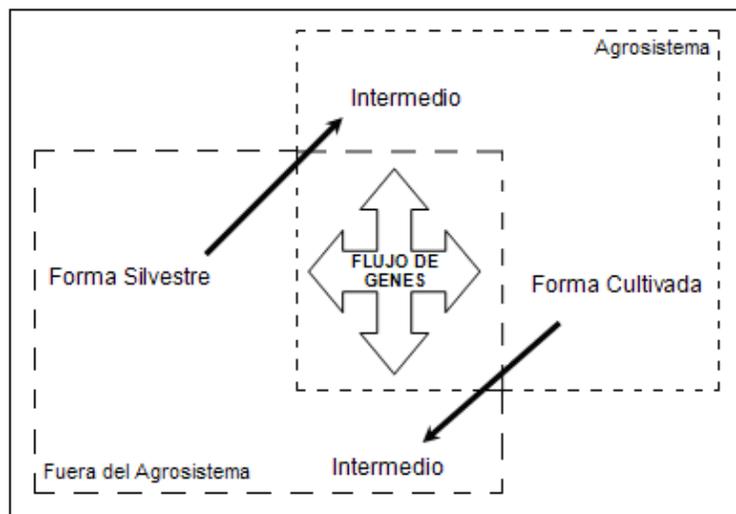


Figura 4. Flujo de genes intra-específico en un sistema silvestre-intermedio-cultivado. (Adaptado de Bartsch y Schmitz, 2002).

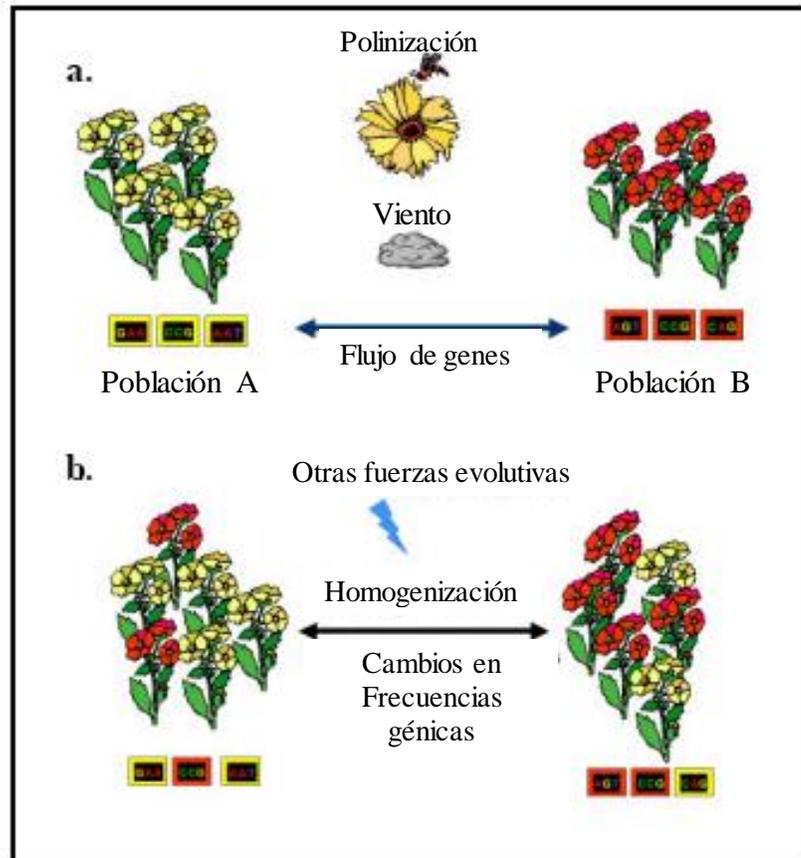


Figura 5. Representación grafica de un proceso de flujo de genes: a. Flujo de genes inicial, b. Homogenización de las poblaciones, debido al cambio de las frecuencias génicas. (Fuente: González-Torres, 2004)

El flujo de genes entre poblaciones y subpoblaciones puede tener efectos significativos sobre la distribución espacial de la variación genética (Hamrick *et al*, 1995). Otros factores implicados dentro del fenómeno de flujo de genes, son las consecuencias ecológicas y genéticas, las cuales dependen de la cantidad y la dirección del flujo de genes, también como el *fitness* de los híbridos (Bartsch *et al*, 2002). Los efectos del flujo de genes principalmente incluyen cambios en el *fitness* de los relativos silvestres, el riesgo concomitante de incrementar los individuos intermedios, los problemas sobre la identidad genética y la diversidad de parientes sexualmente compatibles (Gepts y Papa, 2003; Ellstrand *et al*, 1999).

Existen muchos casos bien estudiados de hibridación natural e introgresión incluyendo plantas silvestres que sugieren que muchas plantas domesticadas podrían hibridarse naturalmente con sus relativos silvestres cuando éstos entran en contacto (Ellstrand, *et al*, 1999).

Algunos estudios de hibridación han sido llevados a cabo en especies como *Phaseolus vulgaris* (fríjol común) (Hoc *et al*, 2003; González-Torres *et al*, 2003; González-Torres, 2004; González-Torres *et al*, 2004), *Rhapanus sativus* (rábano) (Klinger *et al*, 1991), *Helianthus annuus* (girasol) (Arias y Rieseberg, 1994), *Oryza sativa* L. (arroz) (Langevin *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2004), *Medicago sativa* (alfalfa) (Jenczewski *et al*, 1999), *Pinus oocarpa* y *Pinus pringlei* (Upton *et al*, 2001), entre otras.

3.3.1 Flujo de genes en *Phaseolus lunatus* L.

Para el caso del fríjol lima *P. lunatus*, se han encontrado porcentajes de alogamia relativamente bajos entre 4 y 21%; éstas estimaciones han sido hechas a partir de electroforesis de isoenzimas (Maquet *et al*, 1996), pero con niveles de alogamia reportados hasta de un 48% (Baudoin *et al*, 1998), por lo cual el sistema reproductivo de *P. lunatus*, puede ser calificado como de autogamia facultativa.

El flujo génico en *Phaseolus lunatus*, puede verse favorecido principalmente por el comportamiento de alternancia en su sistema reproductor, que puede ser autógeno o alógamo. La estimación de flujo de genes entre poblaciones silvestres de fríjol lima se han realizado mediante marcadores isoenzimáticos (Maquet *et al*, 2001) obteniendo como resultado un flujo de genes restringido y una diferenciación genética relativamente alta.

La presencia de agentes polinizadores dentro de las poblaciones naturales es otro requisito para la ocurrencia del flujo de genes. En *P. Lunatus* se ha determinado la acción de la abeja común (*Apis mellifera* L.) (Figura 6), como la principal dispersadora del polen de *P. lunatus* contribuyendo al intercambio de material genético con otros individuos (Hardy *et al* 1997)



Figura 6. Abeja común (*Apis mellifera*), polinizando una flor de *Phaseolus lunatus* L.

Debido a los valores de alogamia observados y a las repercusiones que puede tener el flujo de genes dentro de las poblaciones en estado natural, adoptar un modelo de estudio como el frijol lima, puede ser de interés no solo para abordar temáticas relacionadas con la conservación o mejoramiento de las diferentes variedades comerciales o potencialmente comerciales, si no que también pueden orientarse los resultados obtenido a temas relacionados con los procesos evolutivos. Ya que el flujo de genes es una potente fuerza evolutiva (Ellstrand *et al*, 1999), y una pequeña cantidad de flujo de genes es capaz de contrarrestar otras fuerzas evolutivas como la mutación, la deriva génica y la selección (Slatkin, 1987).

3.4. MARCADORES UTILIZADOS PARA EVALUAR EL FLUJO DE GENES

3.4.1. Marcadores Morfoagronómicos

La diversidad de los caracteres morfológicos constituye la espina dorsal de los estudios sobre la diversidad genética en cualquiera de sus niveles (Chandran y Pandya, 2000). Los marcadores morfoagronómicos hacen referencia a diferentes características fenotípicas de cultivos con algún nivel de aplicación agronómica.

En este trabajo se evaluó la efectividad de los marcadores morfoagronómicos en la determinación de eventos de flujo génico. Esta metodología fué propuesta en otros

estudios, donde se evaluó el flujo de genes en frijol común (Papa y Gepts, 2003; González-Torres, 2004), obteniendo buenos resultados para evidenciar este fenómeno, así, como para la caracterización de las poblaciones de acuerdo a su forma biológica.

La evaluación de estas características permite que se pueda hacer una aproximación inicial, a la identificación de la variación de las características morfológicas en poblaciones silvestres y cultivadas de *P. lunatus*, y su comportamiento en poblaciones intermedias, que pueden ser el producto de eventos de flujo génico.

Para el caso del género *Phaseolus*, existen muchos caracteres, gobernados por genes nucleares, para realizar diferenciaciones entre las especies, e incluso entre las poblaciones silvestres, intermedias y cultivadas de una determinada especie, dentro de éstas características están: el color de la testa (color primario, secundario y terciario), el tamaño (relacionado con el peso de las semillas), forma de la semilla, hábito de la planta, coloración de las inflorescencias y color del *hilum* entre otros.

Para *P. lunatus*, las principales características morfoagronómicas son el color de la semilla, el peso de la semilla (peso en gramos de 100 semillas) y la forma de ésta (Maquet, 1991). Tales características nos permiten realizar comparaciones entre materiales silvestres y cultivados. Además, nos ayudan a separar materiales con características intermedias, los cuales pueden ser el producto de eventos de flujo génico.

3.4.2. Marcadores Bioquímicos

Los marcadores bioquímicos hacen referencia a diversos tipos de proteínas, isoenzimas o compuestos metabólicos, que pueden alcanzar un alto grado de variabilidad dentro de las poblaciones, ayudando a la caracterización y diferenciación de éstas. Para el caso de *Phaseolus lunatus*, la evaluación de fenómenos de flujo génico entre poblaciones silvestres, había sido estudiada usando isoenzimas (Maquet *et al.*, 2001). Pero aún no existen trabajos que relacionen características como la variación en los patrones electroforéticos de proteínas de reserva y la cantidad de cianuro en semillas, con eventos de flujo de genes entre poblaciones silvestres y cultivadas.

3.4.2.1 Electroforesis de Proteínas

Las lectinas de las plantas son proteínas enlazadas a carbohidratos que están presentes en diferentes órganos y tejidos de muchas especies de plantas, y particularmente en órganos de almacenamiento y semillas (Lioi *et al*, 1999)

Las semillas de fríjol Lima contienen fitohemaglutininas o lectinas, un grupo de sustancias termolábiles que pueden aglutinar las células rojas de la sangre, por virtud de sus sitios receptores para glicoproteínas sobre la superficie celular. Las lectinas principalmente se concentran en los cotiledones, disminuyendo su concentración durante la germinación (al igual que los hidratos de carbono), pero aumentan cuando la semilla está en desarrollo, en la vaina de la planta madre. Las lectinas del fríjol Lima muestran especificidad por la aglutinación de eritrocitos de tipo A y AB en análisis de hemoaglutinación realizados en sangre humana (Summerfield y Roberts, 1985).

En la actualidad existen diversos métodos analíticos para el estudio de las proteínas de reserva tales como: centrifugación, cromatografía, análisis de aminoácidos y electroforesis. A su vez, la electroforesis ha sido desarrollada en geles de almidón de una dimensión, en geles de poliacrilamida con o sin dodecil sulfato sodico (PAGE) y poliacrilamida de dos dimensiones. Entre éstas formas, la de mayor uso en estudios de diversidad ha sido la electroforesis en poliacrilamida vertical (PAGE- SDS) por presentar una buena resolución de las proteínas (Becerra y Paredes, 2000) y un alto grado de polimorfismo respecto a los patrones de bandas generados.

En la electroforesis PAGE-SDS (*SDS-polyacrilamide gel electroforesis*), las proteínas son disueltas en solución con el detergente dodecil sulfato sódico (SDS), cargado negativamente. Cada proteína se une a muchas moléculas del detergente, que desnaturaliza y da a la proteína una carga resultante negativa, bajo éstas circunstancias, todas las proteínas migran hacia el electrodo positivo – estando sus tasas de migración únicamente determinadas (como en el caso de los ácidos nucleicos) por el tamaño (Cooper y Hausman, 2006).

3.4.2.2 Cuantificación de glucósidos cianogénicos

Numerosas plantas contienen glucósidos capaces de liberar cianuro de hidrógeno (HCN) por hidrólisis. Las principales familias vegetales que poseen ésta propiedad son las Araceae, Asteraceae, Calycanthaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Passifloraceae, Proteaceae, Rosaceae, Saxifragaceae y Turneraceae, pero la cianogénesis es más pronunciada en las dicotiledóneas que en las monocotiledóneas (Kakes, 1990). Esos componentes usualmente co-ocurren con β – glucosidasas que clivan azúcares de los glucósidos e hidroxinitrilos, liasas que al descomponerse resultan en cianohidrinas (Seigler *et al*, 1989). Para el caso de *Phaseolus lunatus* se han realizado algunos estudios sobre el contenido de cianuro en materiales silvestres, intermedios y cultivados (Baudoin *et al*, 1989; Vanderborght, 1979).

Algunas formas silvestres del fríjol lima son potencialmente tóxicas por su contenido de glucósidos (faseolunatinas o linamarinas) de cianuro, que pueden liberarse por hidrólisis a través de la acción de la enzima linamarasa o β – glucosidasas (Figura 7) (Summerfield y Roberts, 1985).

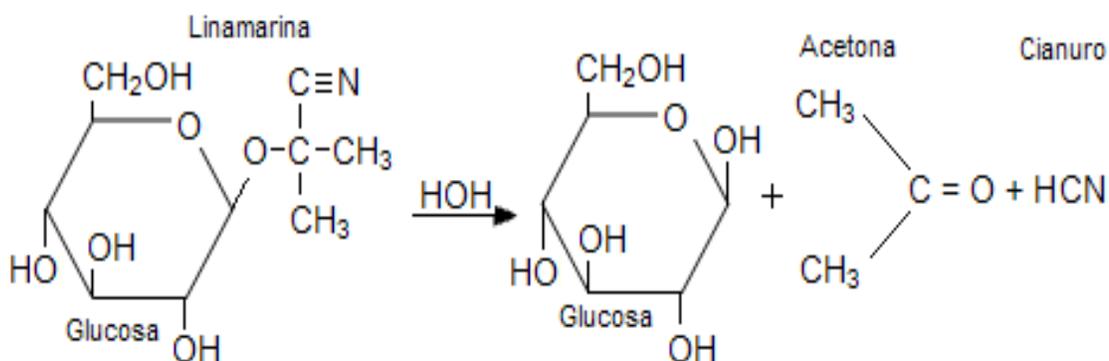


Figura 7. Reacción de hidrólisis de la linamarina, para la liberación de cianuro.

3.4.3. Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares pueden determinar de forma clara aspectos relacionados con la diversidad y la organización de la estructura genética de las poblaciones (Tabla 3). Con los marcadores basados en ADN también se pueden determinar niveles de flujo

génico y establecer el movimiento de genes nucleares y citoplasmáticos (Neal *et al*, 2003).

Según Ferreira y Grattapaglia (1998), los marcadores moleculares presentan ventajas sobre los marcadores morfológicos como:

- a. El nivel de polimorfismo de éstos marcadores es generalmente alto para cada *locus* estudiado, mientras que los marcadores morfológicos poseen un bajo nivel de polimorfismo.
- b. Los marcadores moleculares en general, son neutros con relación a los efectos fenotípicos, con efecto epistático o pleiotrópico mínimo o nulo. Los marcadores morfológicos muchas veces cohiben o restringen el desarrollo normal de la planta: (albinos, mutantes, clorofíticos) y su control genético puede afectar, o ser afectado, por genes que controlan otros caracteres, dificultando la caracterización de los genotipos de interés.
- c. Algunos marcadores moleculares son co-dominantes y contienen mayor cantidad de información genética por locus que los marcadores morfológicos, los cuales en su mayoría, son dominantes o recesivos.

3.4.3.1 Microsatélites o SSR (del ingles “*Simple Sequence Repeats*”)

Los microsatélites son secuencias cortas repetidas aleatoriamente, consistentes de unidades de 1 a 6 pares de bases de longitud (Figura 8), éstos son bastante abundantes en los genomas eucariotas, pero ocurren en menores frecuencias en procariotas (Hoelzel, 1998).

Ellos se encuentran repetidos en *tandem* y dispersas a través del genoma representando muchos *loci*. Cada *locus* tiene distinto número de repeticiones variable, asociándose de ésta manera a alelos específicos de alta variabilidad.

Las regiones que contienen secuencias microsatélites son amplificadas individualmente a través de la PCR utilizando “cebadores” específicos (de 20 a 30 bases) complementarios a las secuencias únicas que flanquean el microsatélite. Los segmentos que se amplifican

a partir de éstos sitios presentan inextenso polimorfismo resultante de la presencia de diferentes números de elementos simples repetidos. Cada microsatélite independientemente del elemento repetido constituye un locus genético altamente variable, multialélico con gran cantidad de información (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Yañez-Amayo, (2002) describe algunos atributos que poseen los microsatélites:

- **Son altamente informativos:** Presentan herencia codominante y muchos alelos son encontrados entre individuos estrechamente relacionados.
- **Ser técnicamente simples:** La tecnología del PCR puede fácil y rápidamente ser utilizada para la automatización en el uso de estos marcadores.
- **Ser una técnica sensible:** Sólo pequeñas cantidades de DNA son requeridas.
- **Son muy abundantes:** están uniformemente dispersos a través del genoma, aproximadamente cada 10 Kbp.
- **Ser analíticamente simples:** Los datos son producidos de forma confiable y altamente reproducibles.
- **Ser ampliamente aplicables:** los *loci* son frecuentemente conservados entre especies relacionadas y algunas veces entre géneros, y
- **Ser de fácil intercambio de datos entre laboratorios:** la información puede ser comunicada por la simple secuencia de los iniciadores, sin la necesidad de la transferencia física de los iniciadores.

Los marcadores microsatélites se ubican dentro de los cromosomas con una distribución principalmente uniforme a través de áreas ínter génicas a excepción de los telómeros y de algunas unidades repetitivas de trinucleótidos que pueden hallarse algunas veces en regiones codificadoras.

Sus aplicaciones como marcadores genéticos van desde su uso para estimar las relaciones espaciales entre segmentos cromosómicos hasta la identificación de individuos y el rastreo de la historia de las poblaciones. La clave de esta versatilidad se basa en el alto nivel de variabilidad que poseen y en la rapidéz y confiabilidad de la información que puede obtenerse en el laboratorio (Chambers y McAvoy, 2000).

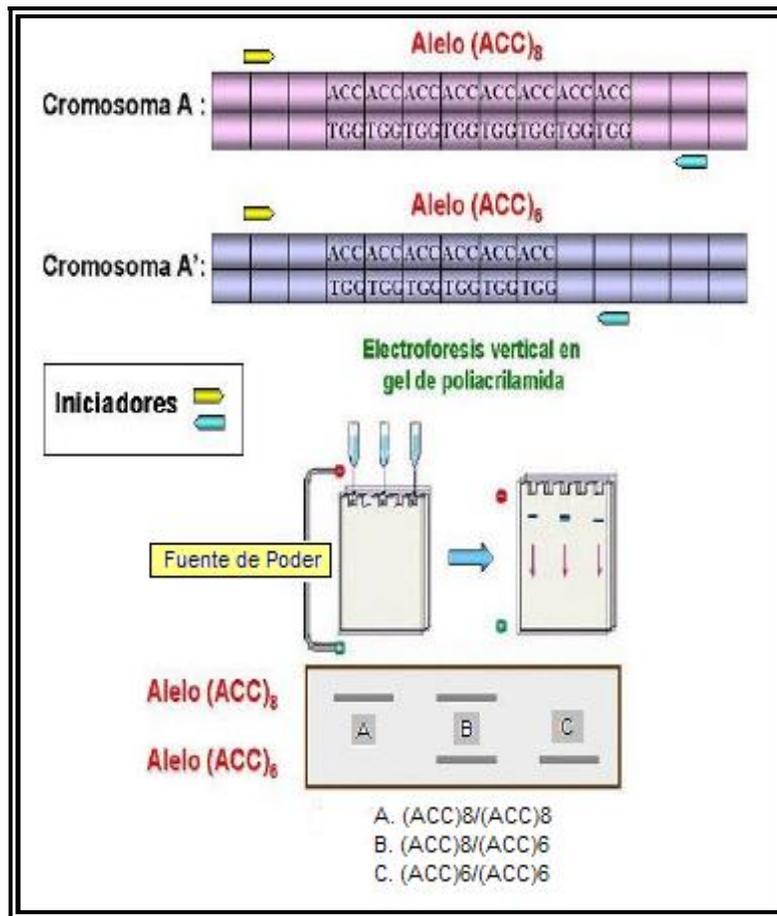


Figura 8. Diagrama que muestra el polimorfismo de los microsatélites debido a las diferencias en su longitud. En un individuo diploide, el cromosoma A contiene el alelo (ACC)₈, mientras que el cromosoma A' en el locus homólogo presenta el alelo (ACC)₆. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando iniciadores diseñados en las regiones flanqueantes, los alelos son amplificados, para luego ser separados mediante la corrida electroforética. El diagrama muestra el patrón de bandas que deben determinar tanto los homocigotos como el heterocigoto para alelos mencionados (Yañez-Amayo, 2002).

Los microsatélites han sido usados en el género *Phaseolus* para desarrollar trabajos en mapeo genético e identificación genotípica (Yu *et al*, 2000), aislamiento y caracterización de microsatélites (Gaitán *et al*, 2002), así como, para estudios sobre la abundancia y variación de éstas secuencias (Yu *et al*, 1999) y flujo de genes en *Phaseolus vulgaris* y entre especies (González-Torres, 2004; González-Torres *et al*, 2003; González-Torres *et al*, 2004).

3.4.3.2 Polimorfismos de ADN de Cloroplasto

Al igual que las mitocondrias, los cloroplastos contienen su propio sistema genético, constituido de ADN circular presentes en múltiples copias en cada organelo, dicho genoma oscila entre 120 y 160 kb y tiene un contenido aproximado de 150 genes (Cooper y Hausman, 2006); La herencia de los genes nucleares es biparental, los genes de los organelos como los cloroplastos en contraste, son heredados generalmente por un sólo parental (herencia uniparental) (Birky, 2001). En el caso de *P. lunatus* es materno, lo que ofrece una gran ventaja para la determinación de la dirección en la cual se está llevando a cabo un posible evento de flujo de genes.

El uso de los RFLP (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) en plantas representa una buena alternativa para realizar diversos estudios relacionados con los tres genomas que existen en ellas; el nuclear (ADNn), mitocondrial (ADNmt) y el de cloroplasto (ADNcp). La aplicación de ésta técnica ha sido de gran utilidad en estudios filogenéticos y de diversidad genética en *Phaseolus vulgaris* (Becerra y Gepts, 1994). Los RFLPs permiten estudiar el genoma con una mayor cobertura al incluir secuencias codificadoras y no codificadoras del ADN (exones e intrones). Esto permite detectar con mayor eficiencia cambios genéticos puntuales, comparado con las proteínas (Wang *et al.*, 1992).

La variación intraespecífica es detectada usando cebadores específicos para ciertas regiones del cloroplasto y realizando digestiones sucesivas con enzimas de restricción con el fin de observar el polimorfismo (PCR-RFLP's) (González-Torres, 2004). Las principales ventajas de los RFLPs radican en la presencia de un número ilimitado de ellos, no son afectados por el medio ambiente, no presentan efectos pleiotrópicos y pueden ser evaluados en cualquier etapa del desarrollo de la planta (Becerra y Paredes, 2000).

Por medio de ésta técnica se pueden identificar polimorfismos por la ganancia o pérdida de sitios de restricción, y determinar la variación ínterespecífica en las poblaciones y sus correspondientes haplotipos, entendiendo un haplotipo de cloroplasto, como una combinación genética única de caracteres o polimorfismos; tal variación ha sido reportada por Chacón (2001, 2005) en *P. vulgaris*, encontrando 12 haplotipos diferentes mediante el

corte específico de los sitios de restricción, encontrando una amplia distribución en América (Figura 9).

Tabla 3. Principales características de los marcadores moleculares más importantes, con especial referencia a RFLPs y SSRs (Guimaraes, 2003).

Característica	RFLP	SSRs	AFLP	RAPD	SNPs
Tipo de revelación	Mono locus	Mono locus	Multi loci	Multi loci	Mono locus
Alelismo	Codominante	Codominante	Dominante	Dominante	Codominante
Tipo de polimorfismo	Secuencia	Secuencia	Secuencia	Secuencia	Secuencia
Nivel de polimorfismo	Buena	Excelente	Excelente	Buena	Excelente
Polimorfismo en el locus	2 a 5 alelos	Múltiples alelos	Presencia/ausencia	Presencia/ausencia	2 alelos
Cantidad de ADN	Grande	Limitada	Limitada	Limitada	Limitada
Calidad del ADN	Buena	Sin restricciones	Buena	Buena	Buena
Reproducibilidad	Buena	Buena	Buena	Baja	Buena
Tiempo	Largo	Rápido cuando el marcador está definido	Rápido	Rápido	Rápido cuando el marcador está definido
Costo	Costoso	Medio	Medio	Medio	Costoso
Tecnicidad	Media	Baja	Media	Baja	Elevada

Esta distribución indica que existe una amplia variación intra-específica en poblaciones silvestres y cultivadas de frijol común, lo que podría ser utilizado como un marcador geográfico. En el caso de *Phaseolus lunatus*, aún no se han determinado los haplotipos existentes.



Figura 9. Distribución geográfica de los haplotipos de ADN de cloroplasto de formas silvestres de frijol común (Adaptado de Chacón, 2001).

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. AREA DE ESTUDIO Y MATERIAL VEGETAL

Las poblaciones estudiadas corresponden a colectas realizadas en México (estados de Campeche y Jalisco, para el control silvestre) y en Guatemala (estado de Jalapa, para el control cultivado), pertenecientes al acervo genético Mesoamericano (Figura 10).

Para el análisis se incluyeron un total de 130 individuos, distribuidos en 8 poblaciones. Cada población con un total de 15 individuos (semillas) (para la población intermedia se evaluaron 24 individuos). Tres poblaciones cultivadas, dos silvestres y una población intermedia), las otras dos poblaciones corresponden a controles cultivados y silvestres respectivamente.

Estas muestras fueron conservadas en el Banco de germoplasma de la Unidad de Recursos Genéticos (Tabla 4), del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).



Figura 10. Área de Estudio (Acervo Genético Mesoamericano). Población control silvestre (cuadro azul) Estado de Jalisco, provincia Zapotán, México; Población control Cultivado (cuadro rojo) Estado de Jalapa, provincia de San Luis Jilotepeque, Guatemala; Población de estudio, complejo silvestre-intermedio-cultivado (cuadro verde) Estado de Campeche, provincias de Hecelchakan y Hopelchen.

Los análisis moleculares y bioquímicos se desarrollaron en el laboratorio de genética molecular de la Unidad de Biotecnología (CIAT) y en el laboratorio de electroforesis de la Unidad de Recursos Genéticos (CIAT) respectivamente.

Tabla 4. Información sobre las colectas del material vegetal (para el presente estudio se utilizaron 15 semillas de cada población).

Población	Colector	Año	País	Estado	Provincia	Forma biológica
G25704	Debouck, D. G. y R. L. Ildefonso	1979	Mexico	Jalisco	Zapotán	Silvestre
G25974	Debouck, D. G., y Vásquez, J. F.	1987	Guatemala	Jalapa	San Luis Jilotepeque	Cultivado
G25737	Debouck, D. G., J. S. Muruaga, y M. R. De Labra	1979	Mexico	Campeche	Hecelchakan	Silvestre
G25789	Debouck, D. G., y M. R. De Labra	1979	Mexico	Campeche	Hopelchen	Silvestre
G25705	Debouck, D. G., J. S. Muruaga, y M. R. De Labra	1979	Mexico	Campeche	Hopelchen	Cultivado
G25786	Debouck, D. G., y M. R. De Labra	1979	Mexico	Campeche	Hopelchen	Cultivado
G25787	Debouck, D. G., y M. R. De Labra	1979	Mexico	Campeche	Hopelchen	Cultivado
G25706	Debouck, D. G., J. S. Muruaga, y M. R. De Labra	1979	Mexico	Campeche	Hopelchen	Intermedio

(Fuente: Base de datos del Banco de Germoplasma, Unidad de Recursos Genéticos del CIAT y Debouck, 1979 [<http://isa.ciat.cgiar.org/urg/showbsearchacc.do>])

4.2 CLASIFICACION DEL MATERIAL

Las poblaciones seleccionadas para éste estudio hacen parte de un complejo silvestre-intermedio-cultivado. Este complejo fue elegido porque durante las colectas en campo realizadas por Debouck (1979) se encontraron características interesantes respecto al color, tamaño y forma de algunas semillas que sugerían posibles individuos intermedios. Durante ese año se colectaron un total de 102 accesiones cultivadas, 11 poblaciones silvestres y 2 intermedias, la presencia de poblaciones aparentemente híbridas o intermedias condujo a la pregunta de si en realidad se está presentando flujo de genes en dichas poblaciones.

La selección de individuos dentro de cada población se realizó, mediante parámetros morfoagronómicos (tamaño y color), con el fin de obtener una caracterización inicial del material, respecto a su forma biológica. Las poblaciones control (silvestre y cultivado), fueron seleccionadas partiendo de la premisa de que son poblaciones altamente conservadas respecto al estatus biológico que representan, ya que fueron colectadas en lugares aislados, donde los posibles eventos de flujo de genes con otras poblaciones eran reducidos.

Cada una de las semillas fue utilizada para los análisis morfoagronómicos, bioquímicos y moleculares (a partir de las plantas obtenidas de las semillas en invernadero). Para la determinación del contenido de cianuro se utilizó una muestra representativa de la población. Utilizando semillas maceradas (0.5, 1 y 2 gramos) de cada una de las poblaciones.

El proceso de germinación y establecimiento de las plántulas de frijol lima se llevó a cabo en los invernaderos de la Unidad de Recursos Genéticos. Desde el análisis morfoagronómico cada semilla era marcada con su respectivo número de identificación (IL), el cual conservaba durante todo su desarrollo en el invernadero (Figura 11).

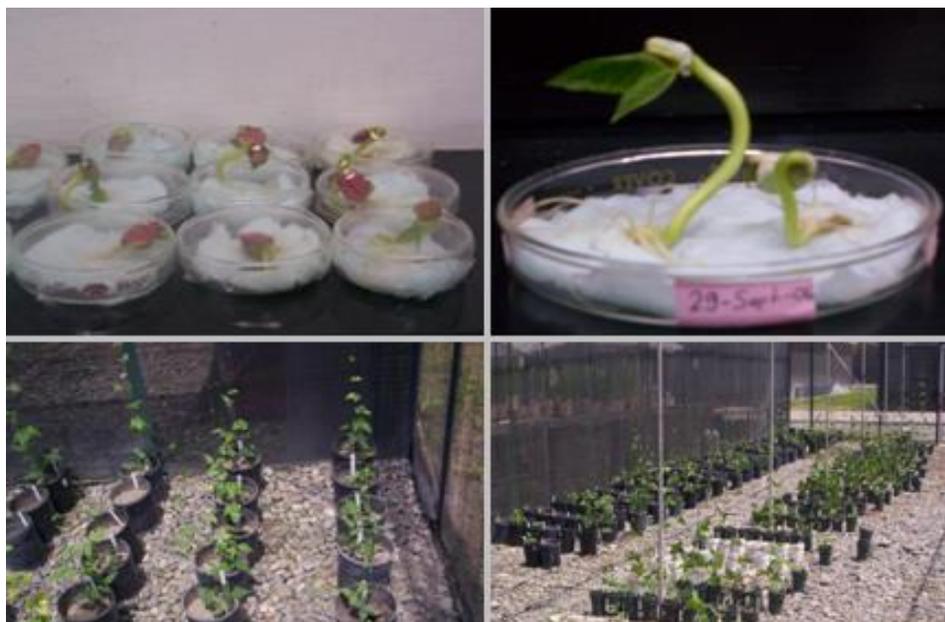


Figura 11. Germinación de las semillas y establecimiento de las plántulas en el invernadero de la Unidad de Recursos Genéticos (CIAT).

4.3 EVALUACION CON MARCADORES

Para el presente trabajo se evaluaron tres tipos de marcadores (morfoagronómicos, bioquímicos y moleculares), con el fin de proveer evidencias que ayuden abordar las preguntas de investigación de una manera más integral.

4.3.1 Marcadores Morfoagronómicos

Para la descripción morfoagronómica se utilizaron las características del género *Phaseolus* y adaptadas para *P. lunatus*, reportadas por Maquet (1991).

Incluyendo para el análisis:

- Color de la testa de las semillas (determinación del color primario, secundario y terciario) (Tabla 5).
- Peso en gramos de 100 semillas
- Forma característica de las semillas pertenecientes a cada población.
- Color del Hipocótilo.
- Tipo de hábito (Figura 12).

El color de la testa, el peso en gramos de 100 semillas y la forma de la semilla, fueron determinados antes del proceso de germinación. Las otras dos características, color del hipocotilo y tipo de hábito, fueron evaluadas en invernadero.

Tabla 5. El color de la testa de la semilla está descrito considerando primero el color más profundo como el color primario, y los otros colores (secundario y terciario) como los superpuestos sobre el primario (ver nota).

Número utilizado para describir el color									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Color	Blanco	Crema	Amarillo	Café	Rosado	Rojo	Púrpura	Negro	Otro

Nota: Un ejemplo puede ser una semilla con un patrón de coloración 2/9/8, lo que indicaría que el color primario de la semilla es crema, presenta manchas grises (color secundario) y está jaspeada de color negro (color terciario).

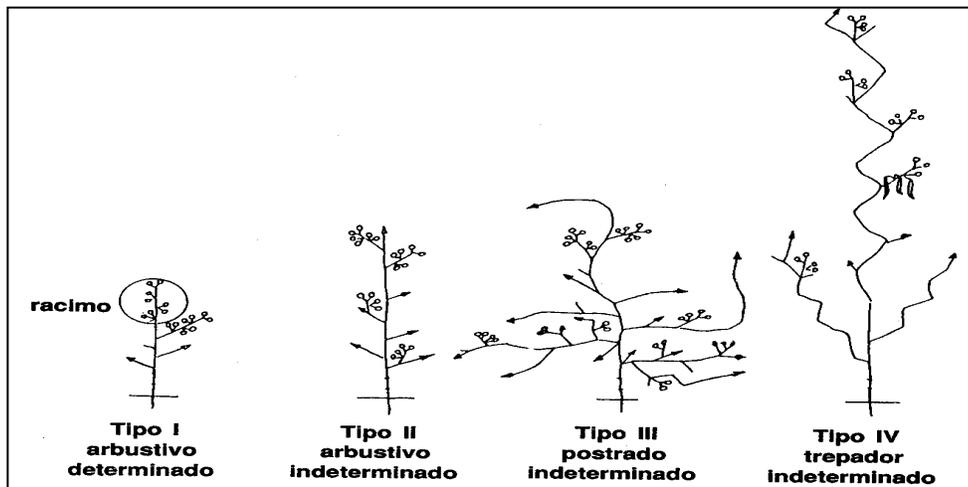


Figura 12. Principales hábitos de crecimiento de las plantas de frijol.

4.3.2 Marcadores bioquímicos

Los marcadores bioquímicos fueron evaluados directamente en las semillas, tanto la determinación de los patrones de amplificación de las proteínas por medio de electroforesis, como la cuantificación de glucósidos cianogénicos.

4.3.2.1 Electroforesis de proteínas (PAGE-SDS)

El análisis de las proteínas de reserva en semillas (lectinas) se realizó mediante la técnica de electroforesis de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico, en una sola dimensión (SDS/PAGE).

Para la extracción de las proteínas se hizo un corte en la parte posterior del rafe, la parte restante de la semilla será conservada para la germinación de la planta (Figura 13).

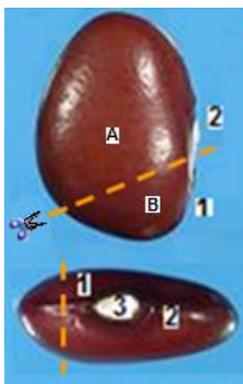


Figura 13. Sitio de corte de la semilla de *P. lunatus*. Rafe (1), Micropilo (2), Hilum (3), Parte de la semilla conservada para la germinación (A), parte de la semilla escindida para el análisis de proteínas (B).

La determinación de los patrones de lectinas, así como los protocolos para la extracción de las proteínas, condiciones de electroforesis y tinción, se siguieron de acuerdo a Gutiérrez-Salgado *et al.* (1995) (Anexo A), y modificados según el laboratorio de electroforesis de la Unidad de Recursos Genéticos del Centro Internacional de Agricultura Tropical.

4.3.2.2 Cuantificación de glucósidos cianogénicos por colorimetría

Para la cuantificación de cianuro se analizó la concentración de linamarina, que para el presente estudio fue determinado para cada una de las formas biológicas (silvestres-intermedias-cultivadas) de *P. lunatus* y para cada población de manera individual.

Para la determinación de la concentración de ésta enzima se cuantificaron los niveles de cianuro total mediante colorimetría, a partir de la maceración de las semillas hasta obtener muestras de 0.5, 1 y 2 gramos respectivamente. Al producto de la maceración se le adicionó la enzima linamarasa, para conseguir que el cianuro fuera liberado.

El cianuro obtenido fue cuantificado con ayuda de un espectrofotómetro a una absorbancia de 600 nm, y los datos obtenidos se evaluaron con una curva de calibración, desarrollada a partir de concentraciones estándar de HCN.

Esta metodología fue inicialmente reportada por Haque y Bradbury (2002) y modificada por Sánchez (2006) para la determinación de glucósidos cianogénicos en yuca.

4.3.3 Marcadores moleculares

4.3.3.1 Extracción y cuantificación de ADN total

Se colectaron trifolios foliares en el invernadero y las muestras fueron conservadas en tubos de eppendorf debidamente marcados y conservados en hielo hasta el traslado del material al laboratorio.

Para la extracción del ADN total, inicialmente se maceró el tejido colectado con nitrógeno líquido y posteriormente se siguió el protocolo de extracción de ADN reportado por Mahuku (2004) (Anexo B).

La cuantificación de las muestras de ADN se realizó en geles de agarosa al 1% (Anexo C), teñidos con bromuro de etidio (Figura 14), cada muestra contenía 2 μL de ADN y 10 μL de blue juice 1X. Las muestras se sirvieron en el gel y se compararon con ADN comercial del Bacteriógafo λ , el cual presenta concentraciones conocidas que oscilan entre 50 ng/ μL y 250 ng/ μL .

Después de obtener las concentraciones de cada una de las muestras éstas fueron diluidas hasta una concentración de 4 ng/ μL y un volumen final de 400 μL .

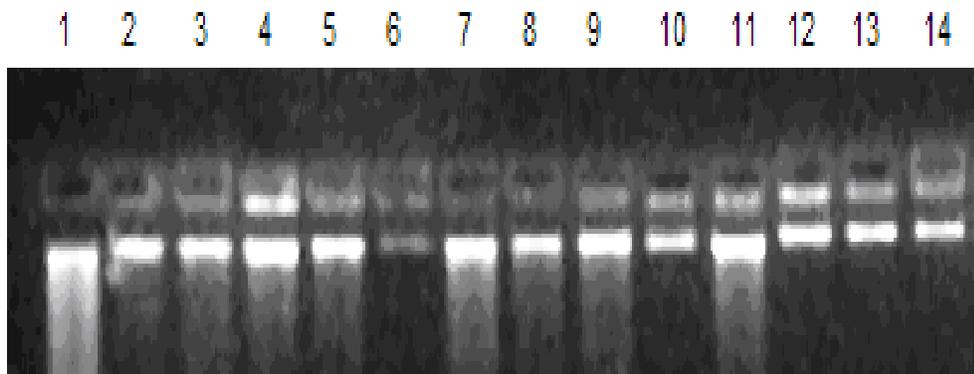


Figura 14. Cuantificación de ADN total, en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

4.3.3.2 Selección y evaluación de marcadores microsatélites

Se evaluaron 68 *loci* de microsatélites descritos previamente por Gaitán-Solis *et al.* (2002) (Anexo D) para el género *Phaseolus*, para determinar cuales podían ser utilizados en *P. lunatus*, teniendo en cuenta los que presentaron un mayor polimorfismo para ésta especie.

Las condiciones de amplificación fueron evaluadas y estandarizadas para cada microsatélite, así, como la determinación del posible tamaño de los alelos del microsatélites (Figura 15).

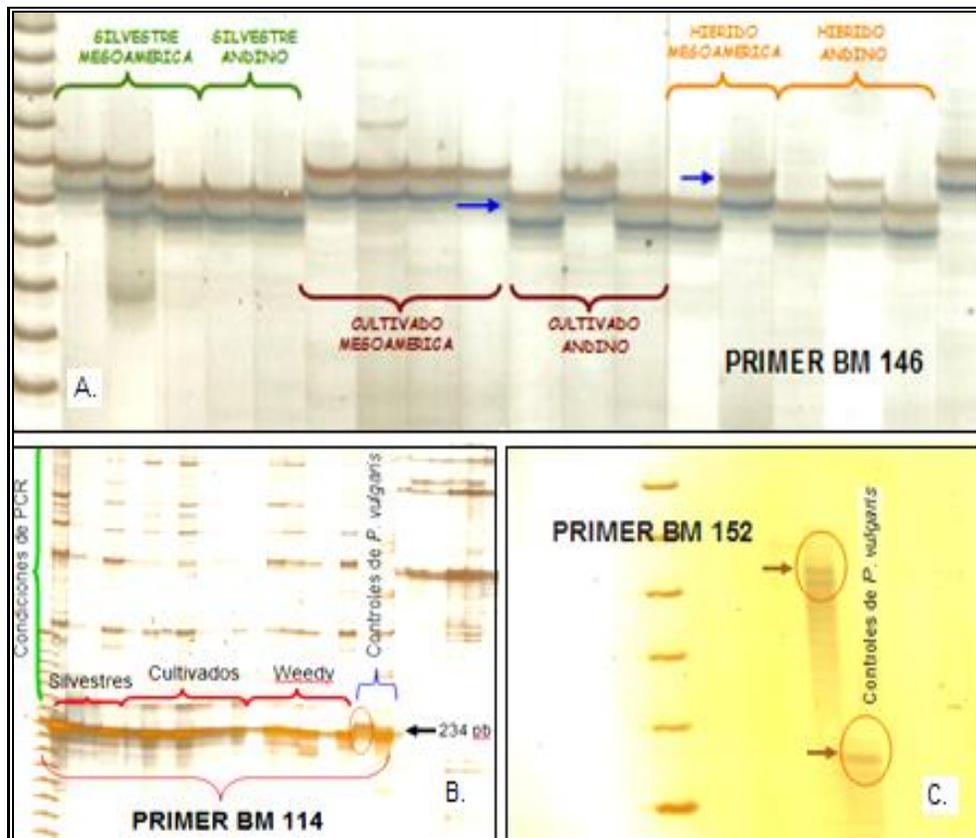


Figura 15. Estandarización de las condiciones de amplificación para cada uno de los microsatélites (geles de poliacrilamida, visualizados mediante tinción en plata): **A.** Cebador BM146, *polimórfico*; **B.** Cebador BM114, *monomórfico*, donde se observa un bandeo inespecífico, el cual fue mejorado en los cebadores polimórficos cambiando las temperaturas de anillamiento y la concentración de magnesio y **C.** Cebador BM152, *no amplificó* para *P. lunatus*, pero sí lo hizo para los controles positivos de *P. vulgaris*.

Para una reacción de amplificación por PCR de 20 μL de volumen final; se utilizaron 5 μL de ADN a una concentración de 4 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 2 μL de Buffer (10X), 2 μL de MgCl_2 (25mM), 0,25 μL de dNTPs (20 mM cada uno), 0,2 μL de cada cebador microsatélite (20 μM cada uno), 0,1 μL de Taq-ADN polimerasa CIAT (en una dilución 1:1) y 5,25 μL de agua ultra pura Gibco. Cada cóctel de PCR se sirvió en placas de 96 pozos, que contenían el ADN de cada uno de los individuos.

El programa de amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-100™ (Programmable Thermal Controller MJ Research, Inc.) (Figura 16).



Figura 16. Condiciones estandarizadas para la amplificación para los SSRs.

4.3.3.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida y secuenciación automática

Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6 % (Anexo E), y su visualización se llevó a cabo utilizando la técnica de tinción en plata y el secuenciador automático ABI PRISM 377. Para este último se utilizaron “cebadores” marcados con fluorocromos (6-FAM, para el color azul; HEX, para el color verde y TET, color amarillo) (Figura 17).

La electroforesis en el secuenciador se realizó de acuerdo con lo descrito por Roa *et al*, (2000). Se mezcló 1.0 µL de producto de PCR con 0.5 µL de patrón de peso molecular interno (*GeneScan TAMRA 350, Perkin Elmer/ Applied Biosystem*) y 2 µL de formamida con buffer de carga (5:1), se desnaturizó la mezcla a 95 °C durante 2 minutos. La mezcla se cargó en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 4% conteniendo 6 M de urea. La electroforesis se realizó con tampón TBE 1X en un secuenciador automático de DNA ABI Prism 377 (*Perkin Elmer/ Applied Biosystem*); usando el programa de análisis Gene Scan versión 2.0.2.

El módulo usado para la corrida electroforética fue GS 36C-2400 (36 cm *well-toread* (WTR), filtro virtual C, 300 V/2400 scan/h 2.5 h). Los alelos fueron determinados y comparados usando el programa Genotyper versión 1.1

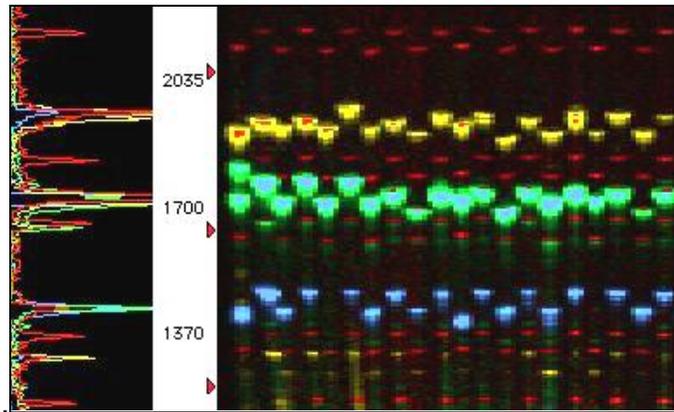


Figura 17. Visualización de los microsatélites utilizando el secuenciador automático ABI PRISM 377, mediante el uso de cebadores marcados con fluorocromos (6-FAM, para el color azul; HEX, para el color verde y TET, color amarillo).

4.3.3.4 RFLP-PCR de ADN de Cloroplasto

El análisis de polimorfismos del ADN de cloroplasto se desarrolló siguiendo la metodología citada por Chacón *et al*, (2005), a partir del análisis de 7 regiones intergénicas utilizadas por Chacón (2001) y 4 regiones específicas utilizadas por Fofana *et al*, (1999) (Tabla 6; Figura 18).

Las condiciones de amplificación fueron evaluadas y estandarizadas, para cada cebador específico del ADN de cloroplasto.

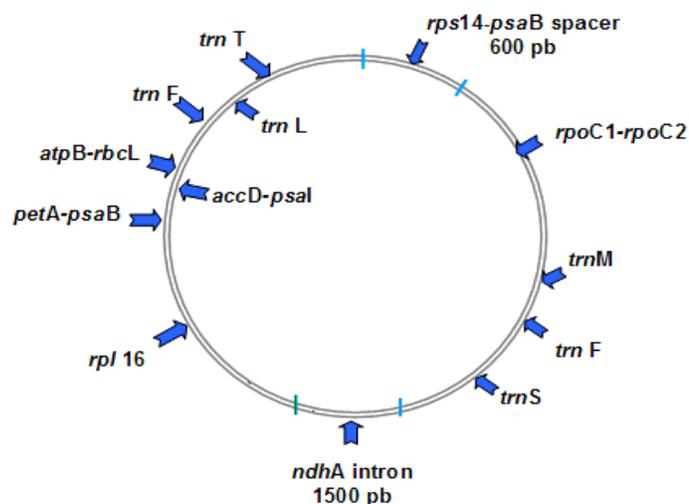


Figura 18. Localización aproximada de las 11 regiones evaluadas del cloroplasto en *Phaseolus lunatus* L. (Fuente: Modificado de Chacón, 2001).

Tabla 6. Regiones de ADN de cloroplasto utilizadas en este estudio.

Región ADNcp	Secuencia (5'-3') para PCR	Dirección	T° anillaje (°C)
<i>Espaciador trnT-trnL</i>	CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC	Adelantado Retrasado	52
<i>Intron trnL</i>	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC	Adelantado Retrasado	52
<i>Espaciador trnL-trnF</i>	GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	Adelantado Retrasado	52
<i>Intron rpl16</i>	GCT ATG CTT AGT GTG TGA CTC CGT T CGT ACC CAT ATT TTT CCA CCA CGA C	Adelantado Retrasado	52
<i>Espaciador rpoC1-rpoC2</i>	GAA GTT CAC TAT GAA TCT TTN GGT ACC TAG ACA TCG GTA CTC CAG TGC	Adelantado Retrasado	52
<i>Espaciador atpB-rbcL</i>	GAA GTA GTA GGA TTG ATT CTC TAC AGT TGT CCA TGT ACC AG	Adelantado Retrasado	50
<i>Espaciador rps14-psaB</i>	CAT TTC ACG AAG TAT GTG TCC G TGG CGT GGA TAT TGG CAG GA	Adelantado Retrasado	55
<i>Región petA-psbB</i>	GCA TCT GTT ATT TTG GCA CA TAC CTT CCC TAT TCA TTG CG	Adelantado Retrasado	53
<i>Intron ndhA</i>	GGW CTT CTY ATG KCR GGA TAT RGM TC CTG YGC TTC MAC TAT ATC AAC TGT AC	Adelantado Retrasado	42
<i>Espaciador accD-psaI</i>	GGA AGT TTG AGC TTT ATG CAA ATG G AGA AGC CAT TGC AAT TGC CGG AAA	Adelantado Retrasado	55
<i>atpB-rbcL</i>	GTG TCA ATC ACT TCC ATT CC GTA AAA TCA AGT CCA CCG CG	Adelantado Retrasado	53
<i>petA-psbE</i>	GCA TCT GTT ATT TTG GCA CA TAC CTT CCC TAT TCA TTG CG	Adelantado Retrasado	53
<i>PsbC.tRNAs_{er}</i>	GGT CGT GAC CAA GAA ACC AC GGT TCG AAT CCC TCT CTC TC	Adelantado Retrasado	62
<i>tRNAs_{er}-tRNA_{met}</i>	GAG AGA GAG GGA TTC GAA CC CAT TAA CCT GAG GTC ACG GG	Adelantado Retrasado	56
<i>tRNA_{thr}-tRNA_{phe}</i>	CAT TAC AAA TGC GTG CTC T ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	Adelantado Retrasado	54

N= Cualquier base, W= A o T, Y= C o T, K= G o T, R= A o G, M= A o C

Para una reacción de amplificación por PCR de 25 μL de volumen final; se utilizaron 5 μL de ADN a una concentración de 4 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 2,5 μL de Buffer (10X), 2,5 μL de MgCl_2 (25mM), 1 μL de dNTPs (20 mM cada uno), 1 μL de cada cebador (20 μM cada uno), 0,2 μL de Taq-ADN polimerasa CIAT (pura) y 11,8 μL de agua ultra pura Gibco.

Cada coctél de PCR se sirvió en placas de 96 pozos, que contenían el ADN de cada uno de los individuos.

El programa de amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-100™ (Programmable Thermal Controller MJ Research, Inc.). (Figura 19).



Figura 19. Condiciones estandarizadas para la amplificación de las regiones intergenicas de cloroplasto.

La calidad del producto del amplificado fue observada en geles de agarosa al 1,5 %, teñidos con bromuro de etidio (Anexo C). Después de verificar la calidad de la PCR, se procedió a realizar la reacción de restricción de cada una de las regiones amplificadas, utilizando un total de 19 enzimas de restricción (Tabla 7).

Para determinar los haplotipos presentes en las poblaciones analizadas de *Phaseolus lunatus*, se consignó la información obtenida a partir de los sitios de restricción específicos, en una matriz binaria, registrando como 0, el no corte (o ausencia del sitio de restricción) y como 1, la presencia de corte (o existencia del sitio de restricción).

En total se evaluaron 57 sitios de restricción diferentes, en 11 regiones del cloroplasto de frijol Lima. Con el fin de fortalecer los análisis se incluyó la información obtenida para el mismo número de sitios de restricción, evaluados en el acervo Andino de ésta especie (Martinez-Garay, 2007).

El análisis de la información fue realizado por medio del procedimiento CORRESP de SAS v. 8.2, teniendo en cuenta las posibles combinaciones genéticas únicas que se pudieran generar a partir de la información del ADN de cloroplasto. Los haplotipos también fueron corroborados por medio de un programa diseñado a partir del lenguaje de programación Python 2.0 (<http://www.python.org/>)

Tabla 7. Enzimas de restricción utilizadas para evaluar las regiones del cloroplasto y su respectiva secuencia de reconocimiento. Para un total de 57 sitios de restricción evaluados.

Cebador	Región amplificada	Enzima utilizada y secuencia de reconocimiento
CLOR 1	<i>trnT-trnL</i>	<i>Rsa I</i> [GT/AC]
CLOR 2	<i>trnL</i> intron	<i>Hph I</i> [GGTGA (8/7)] <i>Mse I</i> [T/TAA]
CLOR 3	<i>trnL-trnF</i>	<i>Tsp509I</i> [/AATT] <i>Vsp I</i> [AT/TAAT] <i>Ssp I</i> [AAT/ATT]
CLOR 4	<i>rpL16</i> intron	<i>Dra I</i> [TTT/AAA] <i>Pac I</i> [TTAAT/TAA] <i>Rsa I</i> [GT/AC]
CLOR 7	<i>rsp14-psaB</i>	<i>Tsp509I</i> [/AATT] <i>Alu I</i> [AG/CT]
CLOR 9	<i>ndhA</i> intron	<i>Dra I</i> [TTT/AAA]
CLOR 10	<i>accD-psaI</i>	<i>Dde I</i> [C/TNAG]
CLOR 11	<i>atpB-rbcL</i>	<i>Rsa I</i> [GT/AC] <i>Alu I</i> [AG/CT] <i>Nde I</i> [CA/TATG]
CLOR 12	<i>petA-psbE</i>	<i>Sph I</i> [GCATG/C] <i>Hha I</i> [GCG/C] <i>Hinf I</i> [G/ANTC]
CLOR 13	<i>psbC-tRNA^{ser}</i>	<i>Hpa II</i> [C/CGG] <i>Sau 3A I</i> [/GATC] <i>Kpn I</i> [GGTAC/C]
CLOR 15	tRNA ^{thr} -tRNA ^{phe}	<i>Hind III</i> [AAGCTT] <i>Taq α I</i> [T/CGA]

Nota: El punto de clivaje está indicado por “/”, los números en paréntesis indican donde está localizado el punto de clivaje para las enzimas de reconocimiento de secuencias no palindrómicas (número de pares de bases de la secuencia de reconocimiento de la cadena sentido y la cadena antisentido), N indica que puede ser cualquier base la ubicada en ese punto.

4.4 ANALISIS DE DATOS

Los análisis de datos se hicieron preliminarmente con los resultados obtenidos de los microsatélites, para determinar qué alelos están presentes en los estatus biológicos silvestres y cultivados, así como los alelos compartidos por los individuos intermedios y que pueden ser el resultado de casos de flujo de genes.

4.4.1 Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM)

Para observar la estructura poblacional y las características diferenciales de cada uno de los estatus biológicos evaluados, así como las posibles relaciones de los individuos y su dispersión, se utilizó un análisis de correspondencia múltiple (ACM), el cual fué generado a partir de una matriz que incluía los resultados obtenidos para todos los marcadores evaluados, excepto la concentración de glucósidos cianogénicos, cuyo resultado no fué incluido en éste análisis porque fué obtenido a partir de cada población y nó de cada uno de los individuos.

El análisis de correspondencia múltiple relaciona diferentes variables, para ayudarnos a comprender cuál es la tendencia principal de los individuos observados, respecto a cada una de las variables evaluadas. Esto se logra debido a la generación de una representación gráfica, ubicada sobre un plano multidimensional, el cual permite observar las diferencias y similitudes más significativas encontradas con una variable determinada. Estos análisis fueron realizados usando el procedimiento CORRESP de SAS v. 8.2.

4.4.2 Evaluación de la dirección del flujo génico

Para establecer la dirección del flujo de genes se utilizó el estimador m_{γ} (Bertorelle y Excoffier, 1998). El análisis fue hecho con el programa ADMIX_1.0, desarrollado por G. Bertorelle (http://www.unife.it/genetica/Giorgio/giorgio_soft.html) el cual provee un estimador “*bootstrap*” y su desviación estándar.

Por medio de éste programa se estableció el número de veces que el genoma de las poblaciones de un estatus biológico determinado, realizaba un aporte de material genético a poblaciones de un estatus diferente. Determinando si el flujo de genes se estaba presentando desde silvestres a cultivados o viceversa y en que proporción.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL COMPLEJO DE *Phaseolus lunatus* L.

La distribución espacial de las seis poblaciones estudiadas dentro del complejo silvestre-intermedio-cultivado de *P. lunatus*, se determinó a partir de las coordenadas geográficas obtenidas de los sitios de colecta del material biológico (datos de pasaporte de cada accesión). Mediante un mapa generado a partir de la conversión de coordenadas y el análisis del programa ArcMap version 1.0 (programa del sistema ArcGIS, sistemas de información geográfica) (Figura 20).

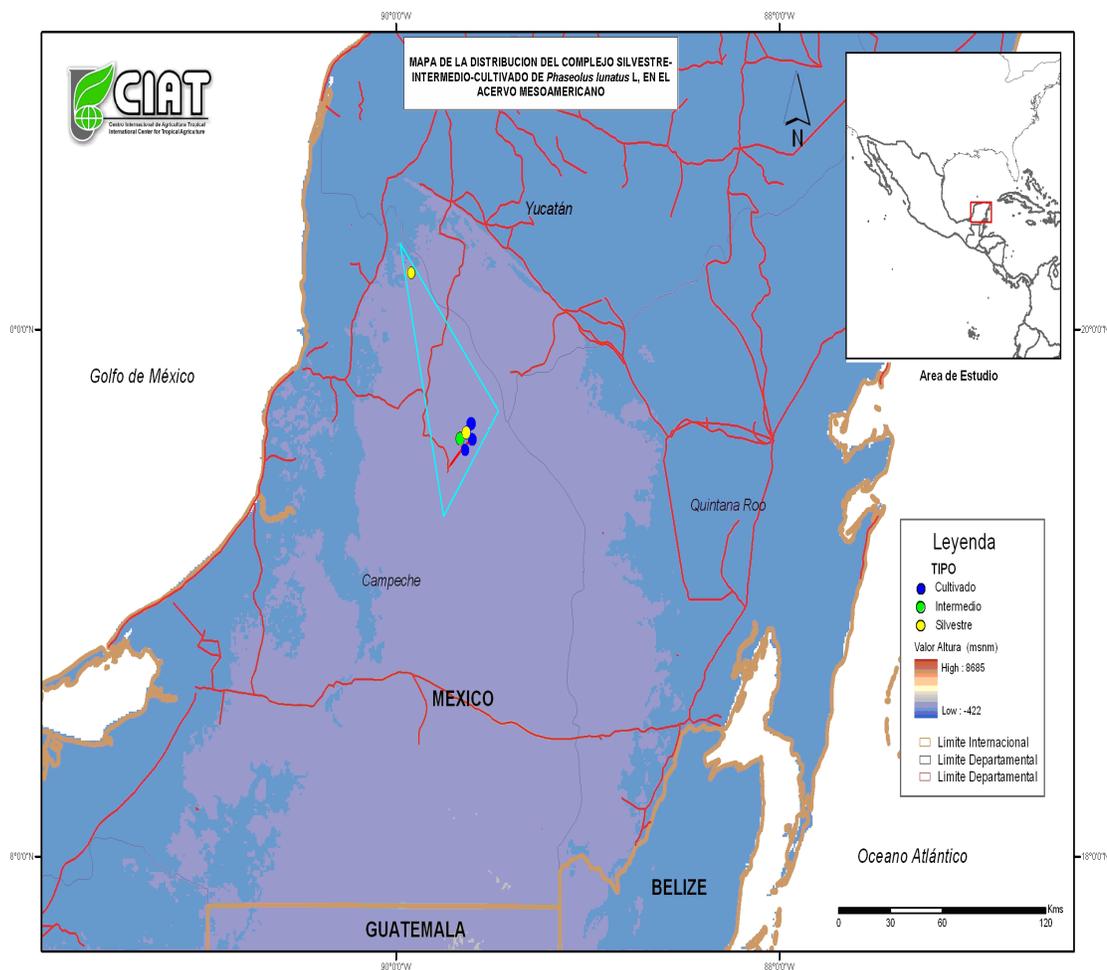


Figura 20. Mapa de la distribución geográfica del complejo silvestre-intermedio-cultivado de *Phaseolus lunatus* L., para el acervo mesoamericano: poblaciones silvestres (puntos amarillos), poblaciones cultivadas (puntos azules) y población intermedia (punto verde). Mostrando una distribución simpátrica de las poblaciones.

Las poblaciones del complejo presentan una distribución simpátrica, lo que podría estar contribuyendo a un posible fenómeno de flujo de genes entre éstas poblaciones. Sin embargo Maquet *et al.*, (2001) al estudiar el flujo de genes para *Phaseolus lunatus*, mediante isoenzimas, en el Valle Central de Costa Rica, encontró que las distancias geográficas no explican la variabilidad del flujo de genes. Pero los polinizadores pueden recorrer distancias muy cercanas entre silvestres y cultivados, separados por unos pocos metros, lo que puede facilitar e incrementar el intercambio de material genético.

Entre los principales polinizadores que han sido reportados para frijol Lima se encuentran *Apis mellifera* (Apidae) y *Xylocopa spp.* (Anthophoridae), estas especies pueden contribuir de manera potencial a la dispersión de polen en cortas y largas distancias interflorales respectivamente (Hardy *et al.*, 1997). Aunque los eventos de polinización cruzada han sido atribuidos principalmente a la arquitectura floral, en relación con la facilitación mecánica por extrusión del estigma en la antesis, con ayuda de polinizadores (Webster *et al.*, 1979). La posibilidad de que el flujo de genes en *Phaseolus lunatus*, dentro del área evaluada, pueda verse facilitado por mecanismos de polinización anemofila, podría ser tenido en cuenta para futuros estudios; debido principalmente a la relación existente entre dos características de la región, la primera de ellas es, la presencia de vientos durante todo el año en el estado de Campeche. Los vientos procedentes del nordeste se presentan fundamentalmente en los meses de noviembre a marzo; Para los meses de septiembre y octubre el viento que viene del norte tiende a alinearse en dirección este-oeste; Durante los meses de junio a agosto los vientos que afectan ésta región proceden del sureste; en mayo y abril éstos vientos tienden a orientarse de sur a norte. En general las brisas marinas que soplan del nordeste durante gran parte del año son los vientos predominantes (Fuente: <http://www.campeche.gob.mx/>).

La otra característica es el relieve de la península de Yucatán y especialmente del estado de Campeche, que se caracteriza por ser fundamentalmente llano, con una altitud media que apenas alcanza los 300 metros y con pendientes hasta un máximo de 15 % (Figura 21). Tales características podrían facilitar el intercambio de material genético entre poblaciones. Esta hipótesis podría apoyar la existencia de eventos de flujo génico entre lugares muy distantes, dentro de la península de Yucatán.



Figura 21. Topografía del estado de Campeche, en la península de Yucatán. Relieve formado por una planicie que apenas alcanza los 300 metros de altitud. (Fuente: Corbis/Galen Rowell).

5.2 CARACTERIZACIÓN MORFOAGRONÓMICA

Dentro de las características morfoagronómicas evaluadas, las que mayor información aportaron a una caracterización de los diferentes estatus o grupos biológicos (silvestres, intermedios y cultivados), fueron: el color de la testa y el peso en gramos de 100 semillas. La variación de las características morfológicas en semillas ha sido uno de los principales criterios que se han utilizado para explicar el origen y la diversidad del frijol lima (Vargas et al, 2003), además la evaluación de caracteres morfológicos demostró ser una buena metodología en estudios de flujo de genes en frijol común, *Phaseolus vulgaris* (Papa y Gepts, 2003; González-Torres, 2004) y en nuestro caso también demostró ser un buen marcador de la variación entre grupos biológicos de ésta especie. Además de aportar evidencias sobre los eventos de flujo génico en *P. lunatus*.

El color del hipocótilo y el tipo de hábito, no presentaron una variación significativa dentro de las poblaciones siendo el tipo de hábito trepador indeterminado, el único que se observó dentro del complejo.

El tamaño de las semillas, representado como el peso en gramos de 100 semillas, demostró ser un buen marcador morfoagronómico para discriminar los tres estatus biológicos (Figura 22), guardando relación con otros estudios sobre la variación en el tamaño de las semillas de *Phaseolus lunatus*, en donde las evaluaciones estuvieron dirigidas a la determinación del peso de las mismas (Maquet, 1995, Esquivel *et al.* 1990 y Vargas *et al.*, 2003).

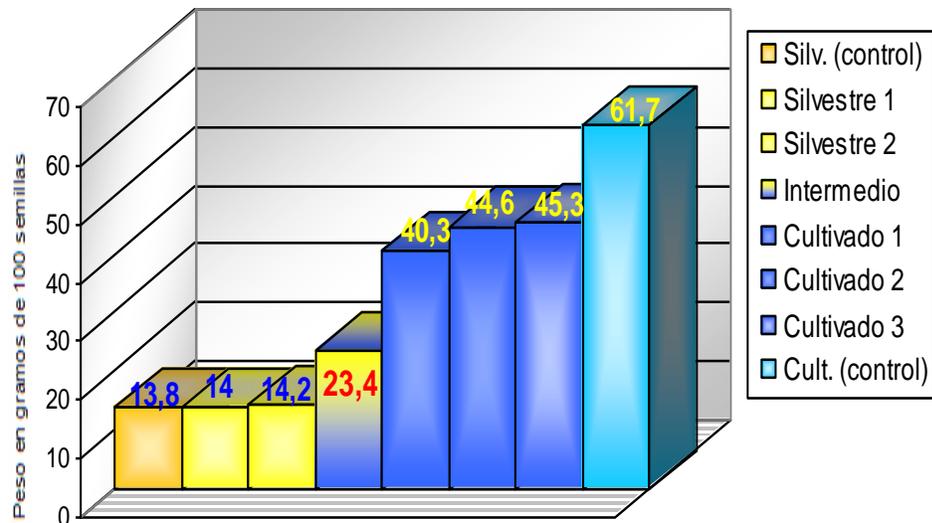


Figura 22. Tamaño de las semillas, determinado por el peso en gramos de 100 semillas. Incluyendo las 6 poblaciones del complejo y dos controles (silvestre y cultivado).

El peso promedio de las poblaciones silvestres fué de 14 y 14,2 gramos respectivamente, lo que ubica ambas poblaciones dentro de un tamaño pequeño (< 14 g/100 semillas); la población intermedia, resultado de posibles eventos de flujo de genes, tuvo un peso de 23,4 gramos, correspondiente a semillas de tamaño mediano (entre 14 y 24 g/100 semillas) y las tres poblaciones cultivadas obtuvieron pesos entre 40,3 y 45,3 gramos, lo cual las sitúa en el rango de semillas grandes (más de 24 g/100 semillas).

Estos resultados coinciden con características de las poblaciones silvestres, en las cuales se pueden encontrar semillas muy pequeñas, contrario a lo observado para poblaciones cultivadas, en las cuales existe una marcada tendencia a presentar tamaños grandes, debido a procesos de domesticación y al mejoramiento convencional que ha tenido ésta especie. Similares resultados han sido obtenidos en otros estudios, donde se evaluó el

peso de las semillas y se logró establecer una diferenciación entre poblaciones silvestres y cultivadas (Martínez-Castillo *et al.* 2003; Ballesteros, 1999).

Las poblaciones cultivadas incluidas en éste trabajo corresponderían al cultigrupo potato (semillas entre 24-53 gramos/100 semillas), según lo reportado por trabajos como los de Baudoin (1988), Debouck *et al.* (1989), Esquivel *et al.* (1990) y Lioi *et al.* (1991).

La población intermedia estuvo representada por un tamaño mediano, lo que indicaría que ésta población no guarda relación para ésta característica morfológica, con los individuos silvestres y cultivados dentro del complejo; dicho tamaño intermedio, podría sugerir un proceso de hibridación natural, donde contribuyen genes de ambos materiales parentales (donde el peso en gramos de 100 semillas sería una característica resultante de la acción de varios genes nucleares). Este resultado es una aproximación inicial a la existencia de un posible flujo génico, resultante de polinización cruzada entre éstas poblaciones, que estarían generando individuos con un tamaño (o peso) intermedio. Lo que se relaciona con el hecho de que se espera que el intercambio de genes nucleares, sea expresado en el tamaño de semilla (mayor con respecto al tamaño de la forma silvestre y menor que el tamaño de semilla cultivada) (González-Torres, 2004)

Diferentes autores han propuesto que el tamaño de las semillas es una de las características morfológicas más estables en las plantas (Harper, 1977, Citado en: Vargas *et al.*, 2003). Sin embargo, numerosos estudios demuestran que el tamaño de las semillas puede variar dentro de las poblaciones y dentro de plantas de una misma especie. Así, como la existencia de una marcada variabilidad en el peso de las semillas, en relación con plantas de crecimiento indeterminado (Vargas *et al.*, 2003), como es el caso de las poblaciones evaluadas en este trabajo.

Los resultados obtenidos en éste trabajo para el tamaño de las semillas, concuerdan con una poca variación dentro de las poblaciones y mucha variación entre poblaciones de estados biológicos diferentes (Figura 23). Otros estudios desarrollados en poblaciones silvestres, han concluido que existe muy poca variación intrapoblacional y una gran variabilidad interpoblacional (Rocha *et al.* 1997, 2002; Vargas *et al.* 2001, 2003). Tal distribución de la variación genética, puede estar directamente relacionado con especies

que presentan altos niveles de autofertilización (Vargas et al, 2003), como es el caso del frijol lima, cuyo sistemas de reproducción es predominantemente autógamo.

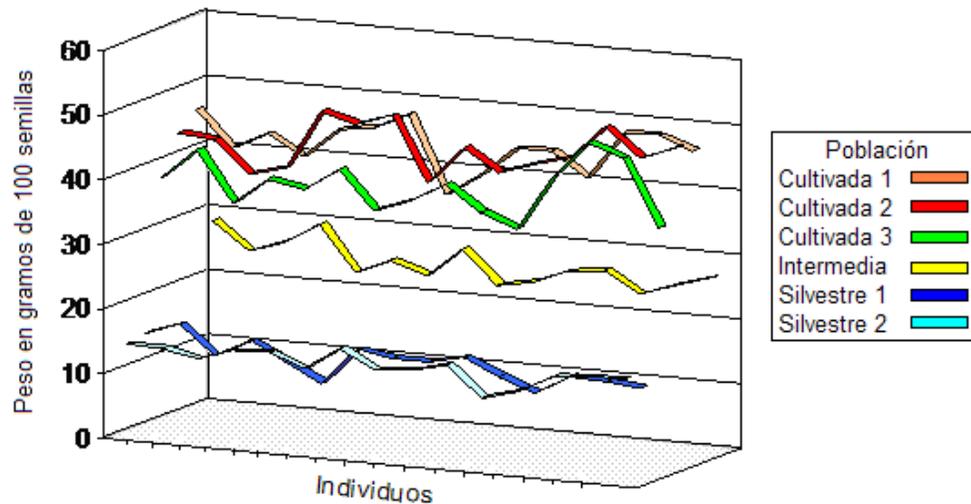


Figura 23. Variación del peso de las semillas dentro de cada población y entre grupos biológicos del complejo silvestre-intermedio-cultivado de *Phaseolus lunatus*, para el acervo Mesoamericano. (Accesiones: Cultivada 1, G25705; Cultivada 2, G25786; Cultivada 3, G25787; Intermedia, G25706; Silvestre 1, G25737; Silvestre 2, G25789).

Los colores de las semillas encontrados dentro de cada población, no siempre son una característica que defina estrictamente la condición biológica de un individuo, pero marcan algunas pautas para diferenciar entre silvestres y cultivados. En nuestro caso se presentó una tendencia a que los individuos intermedios compartieran colores de poblaciones silvestres, así como de cultivadas (Figura 24).

El color negro, que sólo estaba presente en las poblaciones silvestres y el color café exclusivo de los cultivados, aparecieron en los intermedios. La característica color puede ser de gran ayuda en una fase inicial de reconocimiento de posibles individuos híbridos, o para la determinación de poblaciones por estatus biológico, pero se debe tener mucho cuidado, ya que en nuestro caso los individuos pertenecen a poblaciones naturales, de las cuales no se conoce su estado generacional. Dicho estado generacional podría influenciar la presencia de determinados colores, debido a procesos de segregación y a la dominancia de los genes que gobiernan esta característica.

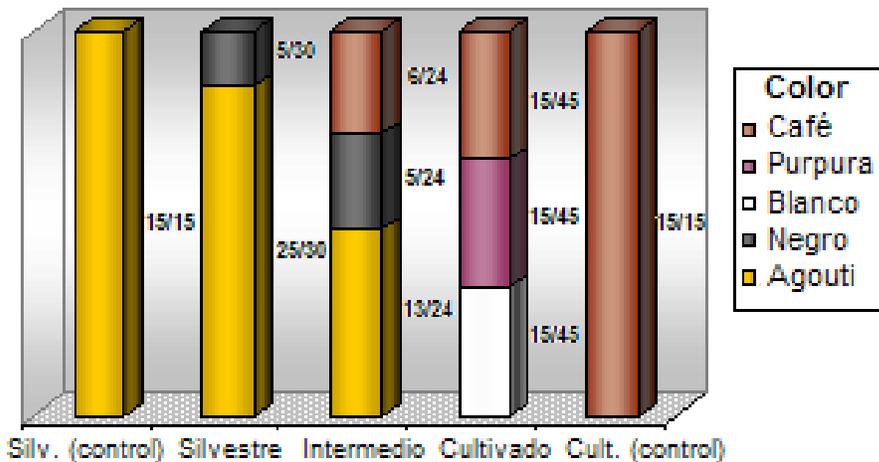


Figura 24. Colores encontrados en cada uno de los estatus biológicos del complejo y en los controles utilizados, con sus respectivas frecuencias.

La forma de la semilla, no fué una característica incluida dentro del análisis de correspondencia múltiple, pero es una característica interesante en relación al estatus biológico (Figura 25) ya que las poblaciones silvestres presentaron semillas con formas muy variables, donde predominaron las de tipo ovoide, pero con cierta tendencia a ser irregulares. Las poblaciones cultivadas presentaron formas arriñonadas y con menos variación dentro de las poblaciones. Para el caso de la población intermedia la forma fué más variable, encontrándose formas ovoides, arriñonadas y alargadas, lo que sugiere que la forma podría ser una característica ligada al flujo genético.



Figura 25. Formas de la semilla encontradas para cada uno de los estatus biológicos de *Phaseolus lunatus* L.: **A.** Poblaciones silvestres, con formas ovoides e irregulares; **B.** Población intermedia, presentando formas variables de tipo alargado, ovoide y arriñonado; **C.** Poblaciones cultivadas, con formas arriñonadas.

5.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Las dos características bioquímicas evaluadas (proteínas de reserva y concentración de glucosidos cianogénicos) dentro del complejo de *P. lunatus*, aportaron información importante para la diferenciación de las poblaciones. Sin embargo, la cuantificación del cianuro presente en las semillas, resulto ser el marcador bioquímico más discriminativo en relación al estatus biológico. Además la concentración de este compuesto para el complejo evaluado aporta fuertes evidencias a favor del flujo génico entre formas cultivadas y silvestres.

5.3.1 Patrones protéicos encontrados

Para las poblaciones evaluadas se obtuvieron cuatro patrones electroforéticos, correspondientes a M1, M2, M4 y M8 (Figura 26).

El patrón M1 fué el más común dentro del complejo con una representación del 68,2%, seguido de M2 con un 10% y los patrones M8 y M4 con 4,65% y 2,32% respectivamente (Tabla 8). Las lectinas M1 y M2 se encontraron en los tres estatus biológicos

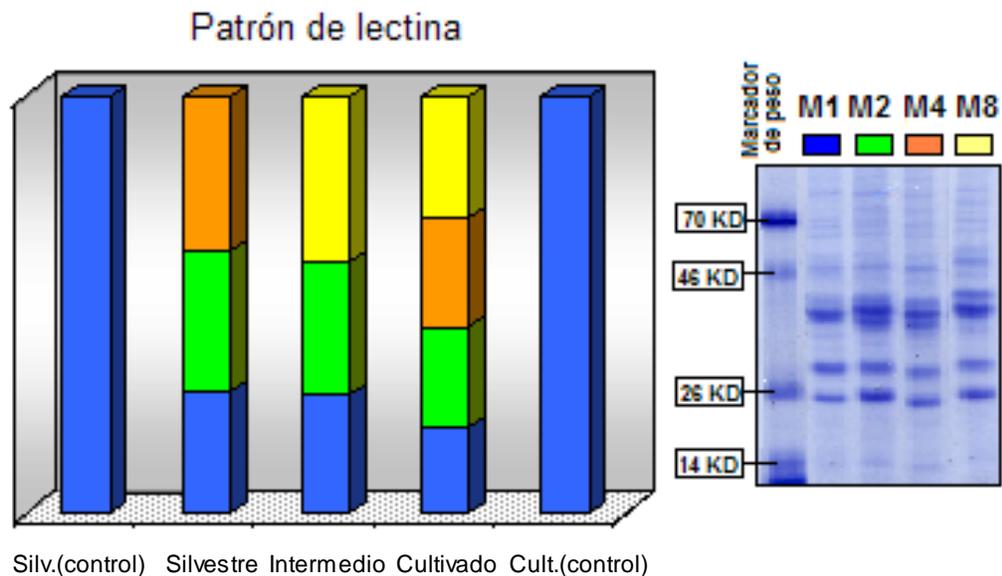


Figura 26. Patrones electroforéticos de lectinas encontrados dentro del complejo silvestre-intermedio-cultivado de *Phaseolus lunatus* L, para el acervo Mesoamericano.

La variante M1 estuvo presente en todas las poblaciones, incluyendo las de control, en las cuales fué el único patrón encontrado. Un resultado similar es reportado por Maquet *et al.* (1990) en cuyo trabajo encontró que el patrón M1 era el más predominante para semillas cultivadas de tamaño pequeño y que algunas poblaciones brasileñas cultivadas de semillas grandes, exhibían éste mismo patrón. También Gutiérrez *et al.* (1995) y Lioi *et al.* (1999), determinaron que el patrón M1, presentaba una alta frecuencia en accesiones cultivadas y silvestres, con una amplia distribución geográfica desde Jalisco en México, hasta el Chaco en Argentina y a través de Guatemala, Costa Rica y Colombia.

Tabla 8. Patrones de lectinas encontrados en las diferentes formas biológicas evaluadas..

Forma biológica	Patrones de Lectinas	Numero de individuos /Total
Silvestre N=45	M1	31/45
	M2	9/45
	M4	1/45
Intermedio N=24	M1	13/24
	M2	4/24
	M8	5/24
Cultivado N=60	M1	44/60
	M2	2/60
	M4	2/60
	M8	1/60

El patrón M4, sólo se determinó en poblaciones silvestres (2,2%) y en cultivadas (3,3%), en muy bajas frecuencias. Esta variante ha sido poco reportada y con una estrecha distribución, restringida al estado de Chiapas en México y en formas cultivadas y silvestres (Gutiérrez *et al.* 1995).

La variante M2 fué reportada en dos poblaciones Mexicanas, así como en poblaciones silvestres (Gutiérrez *et al.* 1995). También ha sido encontrada con una alta frecuencia para formas cultivadas (Lioi *et al.* 1999). Esos resultados coinciden con lo encontrado en éste trabajo donde se presenta el patrón M2 en los tres grupos biológicos, pero con un mayor porcentaje en silvestres (7%) y en intermedios (3,1%).

El patrón M8 fué exclusivo de las formas cultivadas (1,6%) y de la población intermedia (20%). En contraste con lo encontrado por Gutiérrez *et al.* (1995) y Lioi *et al.* (1999), donde la variante M8 es reportada únicamente para formas silvestres, en una baja frecuencia.

Por lo tanto los patrones M2 y M8, encontrados en el grupo intermedio, podrían estar mostrando una baja tendencia a ser el resultado de eventos de flujo génico dentro del complejo, sin embargo este resultado no es concluyente por si solo y podría también estar mostrando problemas con el muestreo realizado. Además los posibles eventos de introgresión desde cultivados hacia intermedios podría estar relacionado con la variante M8.

5.3.2 Concentraciones poblacionales de glucósidos cianogénicos

La presencia de glucósidos cianogénicos y de enzimas, como la linamarasa que catalizan la producción de cianuro a través de hidrólisis, ha sido ampliamente reportada para el frijol lima, *Phaseolus lunatus*. (Seigler *et al.* 1989; Vanderborght, 1979; Baudoin *et al.* 1989; Kakes, 1990; Baudoin *et al.* 1991). Razón por la cual, la concentración de cianuro como componente antinutricional en las semillas, se utilizó como un posible marcador bioquímico para la caracterización de las formas biológicas del complejo y de ésta manera establecer si el marcador propuesto podía fortalecer las evidencias sobre el flujo génico para las poblaciones estudiadas. La relación entre los niveles de cianuro y los eventos de flujo de genes, no habían sido reportados anteriormente. Pero en este trabajo se hace un primer análisis de la importancia de este compuesto en la evaluación de dichos casos de intercambio de material genético.

Con la cuantificación de éste compuesto se logró diferenciar y caracterizar satisfactoriamente cada uno de los grupos biológicos (Figura 27). Las mayores concentraciones de cianuro se obtuvieron en las poblaciones silvestres (Tabla 9), con valores entre 1.421 y 2.345 partes por millón. Confirmando los datos obtenidos en Baudoin *et al.* (1989) donde se reportan concentraciones promedio de 2.428 ppm, en 29 accesiones silvestres y por Baudoin *et al.* (1991) que reporta un promedio de 2.148 ppm, en 70 accesiones de ésta misma forma biológica.

Los altos niveles de cianuro en poblaciones silvestres de *Phaseolus lunatus*, han sido atribuidos a un mecanismo de defensa contra animales herbívoros o parásitos de las semillas (Clegg et al, 1979; Francisco y Pimenta, 2000), en 1963 Nayer y Fraenkel (1963), encontraron que la capacidad de ataque del coleóptero *Epilachna varivestis* (familia Coccinellidae) asociado a *Phaseolus lunatus*, disminuía en respuesta a las altas concentraciones de linamarina en la semilla, en un estudio mas reciente desarrollado por Ballhorn *et al.* (2005), se logró determinar que las plantas de frijol lima que presentaban altos niveles de cianuro en tejidos específicos y un aumento en la liberación de cianuro por unidad de tiempo, mostraban una reducción en la depredación causada por *Schistocerca gregaria* (Orthoptera, Acrididae).

En contraste, para los grupos cultivados se encontraron bajas concentraciones de cianuro, con valores ente 39 y 107 ppm (Tabla 9). Estos valores coinciden con lo reportado por autores como Vanderborght (1979), Baudoin *et al.* (1989) y Baudoin *et al.* (1991), donde la mayoría de las accesiones cultivadas que se evaluaron presentaron concentraciones de cianuro bajas.

Estos niveles tan bajos de cianuro en las poblaciones cultivadas están determinados por la presión de selección que realiza el hombre (Vanderborght, 1979) para mejorar las condiciones y características de su producción.

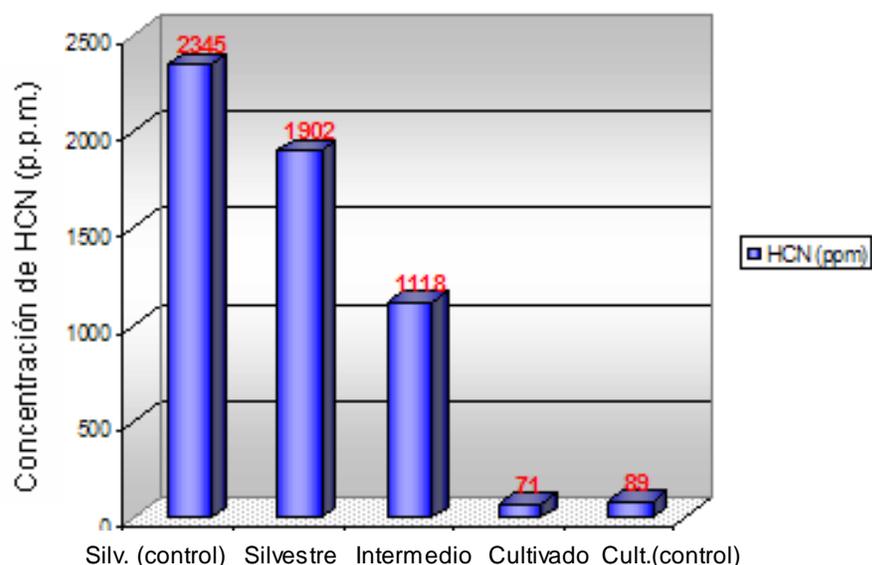


Figura 27. Concentraciones de cianuro encontradas para cada uno de los grupos biológicos dentro del complejo silvestre-intermedio-cultivado de *Phaseolus lunatus*.

La concentración de cianuro en la población intermedia estuvo representada por un valor intermedio (1.118 ppm) entre los obtenidos para silvestres y cultivados. Lo que podría sugerir que ésta concentración intermedia es el resultado de un evento de flujo génico.

Esto puede explicarse partiendo del hecho de que los alelos que gobiernan la producción de cianoglucósidos en plantas generalmente son dominantes, pero existe cierta tendencia a presentarse una dominancia incompleta, donde un fenotipo heterocigoto es intermedio entre dos valores homocigotos (Hughes y Stirling, 1982). En *Zea mays*, por ejemplo, hay una relación cuantitativa directa entre el contenido de vitamina A y el número de alelos para la pigmentación amarilla (Mangelsdorf y Frads, 1931). Pero en el caso de *Phaseolus lunatus* la herencia de características relacionadas con la cianogénesis ha sido poco estudiada (Baudoin et al. 1991).

Algunas características fenotípicas como el color de la testa de la semilla han sido sugeridas como relacionadas a la concentración de cianuro (Anonymous, 1920: Citado en Liener, 1969; Vanderborght, 1979), lo cual contrasta con los resultados obtenidos en este trabajo, donde no se encontró ninguna correlación entre éstos dos marcadores. En 1991 Baudoin *et al.* (1991), después de evaluar el contenido de cianuro en 1.300 accesiones, tampoco encontró ninguna relación. No obstante, otras características fenotípicas, podrían

estar asociadas a la cantidad de cianuro en esta especie, expresándose bajo dominancia incompleta.

Tabla 9. Concentraciones poblacionales de cianuro obtenidas para cada una de las poblaciones evaluadas, incluyendo los grupos control.

Accesión	Grupo biológico	Concentración de HCN (ppm)	Concentración promedio de HCN*
G25704	Silvestre (control)	2.345	1.902 ppm.
G25737	Silvestre	2.296	
G26789	Silvestre	1.421	
G25706	Intermedio	1.118	1.118 ppm.
G25705	Cultivado	69	71 ppm.
G25786	Cultivado	38	
G25787	Cultivado	107	
G25974	Cultivado (control)	89	

*Concentraciones promedio de HCN, sin incluir los valores obtenidos para los controles silvestre y cultivado.

La presencia de éste compuesto antinutricional en *Phaseolus lunatus* debe verse desde dos perspectivas diferentes, la primera de ellas está relacionada con los posibles efectos que ésta sustancia tóxica pueda tener en la salud humana y que han provocado que su cultivo no sea tan difundido como el del frijol común.

Pero es necesario aclarar que los efectos nocivos reportados, han sido el resultado de equivocaciones o del desconocimiento sobre la preparación culinaria de éste tipo de frijol. Haciéndose necesarios procesos de educación e información sobre las ventajas de ésta leguminosa y el uso adecuado que debe dársele, para un consumo seguro; Además, la mayoría de poblaciones cultivadas que han sido evaluadas, para determinar su concentración de cianuro, por diferentes autores, han registrado valores muy bajos, que no representan un riesgo para el hombre y que son permitidos por las instituciones encargadas de regular el uso de alimentos, como es el caso de los Estados Unidos y

Europa, donde sólo se permiten concentraciones menores a 200 ppm. (Montgomery, 1965).

La otra perspectiva está dirigida a contemplar las repercusiones que ésta característica antinutricional pueda tener para los agricultores y comunidades campesinas, en relación al flujo de genes que puede presentarse entre sus poblaciones cultivadas y los parientes silvestres. Lo que se relaciona directamente con los resultados obtenidos en este estudio, donde se observan formas intermedias o híbridas, con niveles de cianuro también intermedios, pero muy altos en comparación para los reportados para formas cultivadas, y que por eventos de intercambio genético pueden enmascarar concentraciones de cianuro muy altas, en el caso de que la dirección de tal intercambio pudiera darse desde silvestres a cultivados.

Además, La cianogenesis encontrada en esta planta debe ser vista desde un punto de vista integral, enmarcado en la evaluación de posibles ventajas o desventajas agroecológicas y dirigidas hacia programas de mejoramiento, pero no como un obstáculo para su producción, distribución y consumo.

5.4 MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares utilizados (microsatélites y RFLPs-ADNcp) presentaron un alto poder de discriminación entre las poblaciones y entre formas biológicas del complejo. Siendo los microsatélites los que mayor información aportaron, debido a la presencia de alelos exclusivos de cada población.

5.4.1 Evaluación de polimorfismo de los microsatélites

Un total de 68 marcadores microsatélites se evaluaron para establecer cuales presentaban mayores polimorfismos para las poblaciones de *Phaseolus lunatus*.

Después de amplificar el ADN de 17 individuos de fríjol lima, incluyendo muestras del acervo Andino y Mesoamericano, así como de diferentes grupos biológicos. Se obtuvieron 33 microsatélites polimórficos. Estos resultados fueron comparados con el trabajo

realizado por Gaitán-Solis *et al.* (2002), donde se obtuvieron resultados similares (ANEXO F).

El contenido de información polimórfica (PIC del inglés: “*Polymorphic Information Content*”) de los 33 microsatélites fué evaluado, mediante el programa PowerMarker V3.0 (<http://www.powermarker.net.>), obteniendo como resultado un número de 19 microsatélites, los cuales presentaron una mayor cantidad de genotipos y un índice PIC mayor a 0.37 (Tabla 10) y que fueron elegidos porque resultaban ser mas informativos para el análisis molecular de las poblaciones evaluadas.

Las condiciones de amplificación de los microsatélites seleccionados, fueron estandarizadas, para los 19 microsatélites evaluados (Tabla 11). Para todos los individuos analizados dentro de las 8 poblaciones estos marcadores resultaron ser bastante discriminativos y ayudaron a la caracterización de los alelos presentes en cada población, así como los alelos compartidos por la población intermedia y que son el resultado de eventos de flujo de genes.

Tabla 10. Microsatélites escogidos para la evaluación molecular de acuerdo a su índice PIC. (Índice PIC mayor a 0,37).

Marcador	Frecuencia alelica	Número de genotipos	PIC
BM209	0,375	9	0,776733398
GATS91	0,266666667	7	0,768738272
BM211	0,363636364	6	0,746943515
BM143	0,366666667	6	0,669360494
BM140	0,5	5	0,641326904
BM170	0,558823529	6	0,611718909
BM181	0,588235294	5	0,564648412
BM154	0,529411765	5	0,56365914
BM156	0,411764706	3	0,551142826
BM202	0,470588235	3	0,546114151
BM183	0,558823529	6	0,52691389
BM148	0,633333333	5	0,515444444
BM171	0,588235294	4	0,508451467
BM212	0,588235294	4	0,508451467
BM201	0,5	4	0,481356485
BM141	0,617647059	3	0,397162091
BM155	0,705882353	3	0,383903449
BM153	0,529411765	2	0,374133451
AG1	0,529411765	2	0,374133451
BM146	0,529411765	3	0,374133451
BM164	0,588235294	3	0,367093306
BM160	0,588235294	2	0,367093306

La información obtenida de las evaluaciones con microsatélites, fué registrada como el número de bandas obtenido en cada individuo, a dicha información se le realizó un análisis de agrupamiento utilizando en método UPGMA y similitud de Nei (Figura 28). Este análisis separó de manera clara las poblaciones control y las formas biológicas del complejo, además de mostrar el comportamiento de los individuos intermedios, los cuales se encontraron distribuídos en tres grupos diferentes, pero guardando similitudes con silvestres y cultivados.

Todos los individuos silvestres del complejo, se encuentran agrupados con un coeficiente de similitud del 50%. De igual manera todos los cultivados, incluyendo los controles fueron agrupados con una similitud del 53%. Con una diferencia genética del 87% entre cultivados y silvestres (Figura 28).

Algunas muestras intermedias formaron un grupo externo, con un coeficiente de similitud del 49%. Este comportamiento está influenciado por la presencia de alelos nulos (o sin amplificación positiva) en éstos 4 individuos, en 3 de los 19 microsatélites evaluados. Tal diferenciación, podría estar relacionada con procesos de recombinación genética, que han ocasionado cierta divergencia genotípica en estos individuos.

También se obtuvieron dos grupos bien diferenciados con 9 y 10 individuos intermedios respectivamente, los cuales se encuentran incluídos dentro de una de las ramas principales que agrupa las formas cultivadas. Esta relación de formas intermedias y cultivadas presenta un coeficiente de similitud del 23%.

El significado práctico de la evaluación del polimorfismo de los microsatélites, fue aportar evidencias de que los alelos obtenidos permiten diferenciar los materiales en relación a su estatus biológico. Además, al utilizar 19 cebadores de microsatélites, el poder de discriminación entre las poblaciones y la resolución fueron altos, para observar posibles eventos de flujo de genes y fenómenos de introgresión.

Tabla 11. Microsatélites utilizados para la evaluación molecular del genoma de *Phaseolus lunatus* L., para el acervo Mesoamericano.

Nombre	Motivo SSR	(5'-3')	Secuencia cebador	T(°C)
BM143	(GA) ₃₅	Adelantado Retrasado	ATGTTGGGAACCTTTTAGTGTG GGGAAATGAACAGAGGAAA	55
BM156	(CT) ₃₂	Adelantado Retrasado	TGCTTGCA TCTCA GCCAGAATC CTTGTTCACCTCCCATCATAGC	52
BM148	(CAG) ₅ (CAA) ₅ CAT(CAA) ₃ CAT(CAA) ₃	Adelantado Retrasado	AACTAATCCA TTTGCACTACCC TTGAAACTCTCTTTGCA GACAC	58
BM212	(CA) ₁₃	Adelantado Retrasado	TGAACTTTCA GGTATTGA TGAATGA AGGAA GGGATCCAAAGTCACTC	53
BM153	(CA) ₅ (TG)(CA) ₃ CG/CA ₁₀ (TA) ₄	Adelantado Retrasado	TGACAAA CCA TGAATATGCTAAGA CCGTTAGGGAGTTGTTGAGG	50
BM146	(CTGTTG) ₄ (CTG) ₄ (TTG) ₃ (CTG) ₇	Adelantado Retrasado	TGCAGACAAA TTTATGAAGGC GAGATGAGTCCTTTCCCTACCC	58
AG1	(GA) ₈ GGTA(GA) ₅ GGGGACG(AG) ₄	Adelantado Retrasado	GAGCGTCGTCGTTTCGAT CATGCA GAGGAAGCA GACTG	52
BM183	(TC) ₁₄	Adelantado Retrasado	TCTTACAGCCTTGCA GACATC CTCAAA TCTA TTCACTGGTCAGC	52
BM181	(CT) ₁₇	Adelantado Retrasado	TGAGGAGCAAA CAGATGAGG ATGCTGCGAGTTAATGATCG	50
BM202	(GA) ₉ GT(GA) ₄	Adelantado Retrasado	CCTTTACCCACACGCCTTC ATGCGAAA GAGGAACAATCG	58
BM170	(CT) ₅ CCTT(CT) ₁₂	Adelantado Retrasado	AGATAGGGAGCTGGTGGTAGC AGCCAGGTGCAAGACCTTAG	58
GATS91	(GA) ₁₇	Adelantado Retrasado	TCCGTGTTCTCTGTCTGTG GAGTGCGGAA GCGAGTAGAG	52
BM140	(GA) ₃₀	Adelantado Retrasado	CCTACCAAGATTGATTTATGGG TGCAACAACA CATTATGTGAC	55
BM211	(CT) ₁₆	Adelantado Retrasado	CCACCATGTGCTCATGAAGAT ATACCCACA TGCACAAGTTTGG	55
BM141	(GA) ₂₉	Adelantado Retrasado	CTCAAAA CCA CAACGCACC TGAGGAGGAACAATGGTGCC	60
BM201	(GA) ₁₅	Adelantado Retrasado	TGTCACTCTCTCCTCCAAT TGGTGCTACAGACTTGATGG	50
BM171	(GA) ₁₃	Adelantado Retrasado	CTTCCTTGCTGTTTCCACTG TGGCATTTCA GATTAACACTCC	52
BM154	(CT) ₁₇	Adelantado Retrasado	CTGAA TCTGAGGAACGATGACCAG TCTTGCGACCGAGCTTCTCC	50
BM155	(CA) ₈	Adelantado Retrasado	CAGAA GTTAGTGTGGTTTGATACA GTTCA TGTTTGTTTGACAGTTCA	55

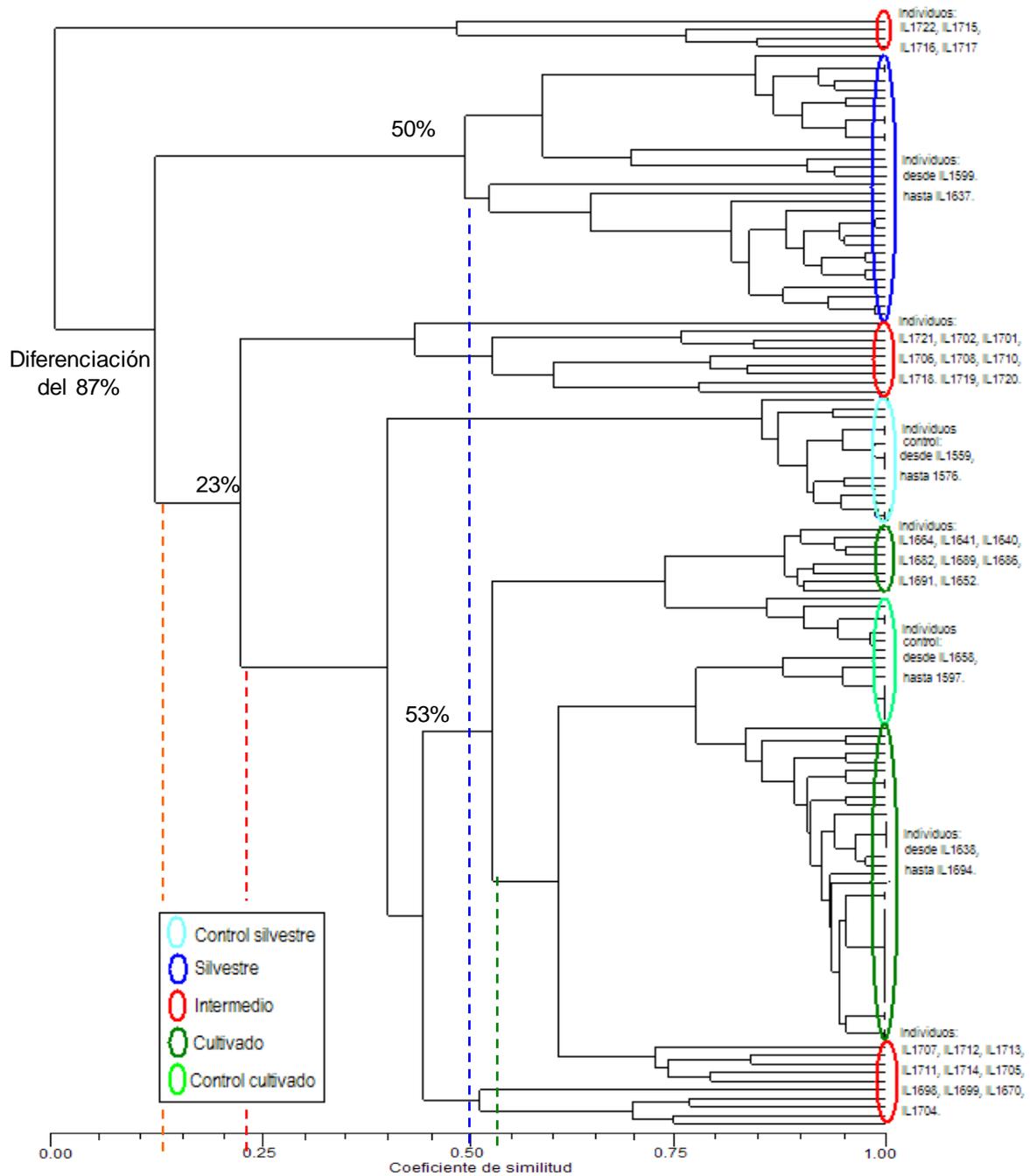


Figura 28. Dendrograma de todos los individuos incluidos en éste estudio, con base en los resultados obtenidos de 19 microsatélites usando el método UPGMA a partir de similitud.

5.4.2 Frecuencias alélicas encontradas

Las frecuencias encontradas para cada microsatélite permitieron realizar una apropiada caracterización y descripción de cada forma biológica (Tabla 12).

Para los individuos silvestres se observaron un total de 52 alelos diferentes; para las poblaciones cultivadas 47 alelos y para los individuos intermedios 67 alelos, además en ésta misma población se determinaron 14 alelos nuevos que no estaban presentes en cultivados o silvestres. Estos nuevos alelos podrían ser el resultado de procesos de recombinación, producto de eventos de flujo génico entre las poblaciones evaluadas o derivados de procesos de intercambio de material genético con poblaciones diferentes a las incluidas en este estudio.

Las formas intermedias también presentaron alelos compartidos con poblaciones silvestres y cultivadas, muchos de los cuales se observaron como alelos exclusivos de estas dos formas biológicas. Debido a la presencia y a la distribución de los alelos encontrados, se logró identificar con precisión el comportamiento de éstos en la población intermedia y se establecieron alelos exclusivos para poblaciones cultivadas y silvestres, que pueden ser de gran ayuda para futuros trabajos relacionados con la estructura genética de *Phaseolus lunatus*.

5.5 POLIMORFISMO DE ADN DE CLOROPLASTO

La determinación de los polimorfismos del cloroplasto permitió definir el número de haplotipos presentes en *Phaseolus lunatus*. Teniendo en cuenta que el haplotipo en nuestro caso está definido como una combinación genética única de caracteres o polimorfismos. El análisis del ADN del cloroplasto pretendía establecer la posible dirección del flujo de genes dentro del complejo silvestre-intermedio-cultivado. Esta metodología fue utilizada con el mismo fin en otras especies como *Phaseolus vulgaris* (Gonzalez-Torres, 2004), a partir de haplotipos definidos anteriormente para la especie basados en las diferentes combinaciones obtenidas como resultado de los polimorfismos obtenidos en diferentes sitios de restricción por Chacón (2001).

En nuestro caso la dirección del flujo de genes no pudo ser determinada a partir de los polimorfismos obtenidos, debido al bajo número de haplotipos encontrados y a la presencia de un solo haplotipo en la población intermedia (Haplotipo 3), el cual se observó también en cultivados y silvestres en una alta frecuencia (Tabla 13). Lo que sugiere que el genoma de cloroplasto de ésta especie se encuentra altamente conservado, pero con una marcada diferenciación entre acervos genéticos. Observándose haplotipos exclusivos para las poblaciones Mesoamericanas y para las Andinas; éstas últimas fueron evaluadas a manera de control y para el mismo número de sitios de restricción que las del complejo Mesoamericano por Martínez-Garay (com, per.).

5.5.1 Haplotipos encontrados

Después de analizar un total de 57 sitios de restricción y analizarlos mediante el software SAS v. 8.2 y el programa diseñado mediante Python, se obtuvieron 6 haplotipos diferentes. Los únicos haplotipos encontrados para el acervo Andino fueron el 2 y 4. En el complejo Mesoamericano se encontraron los haplotipos 1 y 3 (Figura 29); sólo un individuo en la población control silvestre presentó el haplotipo 5 y en la población control se observó un individuo con el haplotipo 4, encontrado únicamente en poblaciones Andinas.

Para *Phaseolus lunatus*, se logró determinar la existencia de 6 haplotipos de cloroplasto, este resultado fue obtenido después de evaluar 14.000 pares de bases en 12 regiones del cloroplasto, este resultado concuerda con lo reportado por Fofana *et al.* (1999), donde se reportaron 6 haplotipos, después de amplificar 8.600 pares de bases, distribuidas en el cloroplasto de *P. lunatus*. La identificación de haplotipos se desarrolló con el fin de establecer la dirección del flujo de genes dentro del complejo (silvestre-intermedio-cultivado). Esta metodología había sido utilizada en otros estudios, para establecer la distribución geográfica del frijol común (Chacón, 2001; Chacón *et al.*, 2005) y para la determinación de la dirección del flujo génico (González-Torres, 2004), con muy buenos resultados debido a la variación encontrada para este genoma en *P. vulgaris*. Para el frijol lima no se pudo establecer la dirección del flujo de genes, mediante esta metodología, debido principalmente a la poca variabilidad encontrada y que indica el alto grado de conservación que presenta el cloroplasto de esta especie para el rango geográfico evaluado, en contraste con el de frijol común. Para determinar la existencia de otros

haplotipos para ésta especie, es necesario evaluar un número mayor de accesiones y en lo posible con una distribución geográfica amplia, para obtener una mayor representación la variación a nivel del ADN de cloroplasto

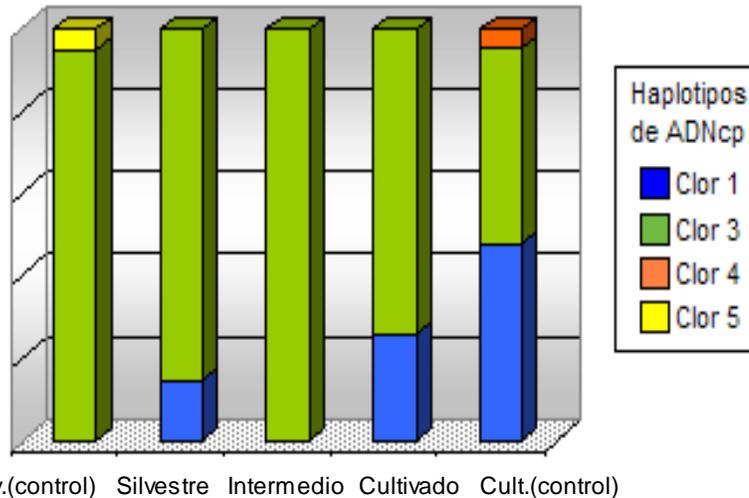


Figura 29. Haplotipos encontrados para *Phaseseolus lunatus*, mediante el análisis de ADN de cloroplasto para las tres formas biológicas evaluadas en el complejo Mesoamericano.

Tabla 13. Frecuencia de los haplotipos encontrados en cada una de las formas biológicas evaluadas y en los controles incluidos.

Forma biológica	Tipo de Haplotipo*	Número de individuos /Total
Silvestre (control) N=15	C13	14/15
	C15	1/15
Silvestre N=30	C11	5/24
	C13	25/24
Intermedio N=24	C13	24/24
Cultivado N=45	C11	6/60
	C13	39/60
Cultivado (control) N=15	C11	5/15
	C13	9/15
	C14	1/15

*El nombre de los haplotipos (C11, C12, C13, C14, C15 y C16) fué asignado para representar los 6 haplotipos encontrados para *phaseolus lunatus*.

5.6 EVIDENCIAS Y DIRECCION DEL FLUJO DE GENES EN *P. lunatus* L.

Mediante la integración de todos los marcadores evaluados, se pudo evidenciar de manera clara la existencia de eventos de flujo génico, dentro del complejo evaluado para *Phaseolus lunatus* en su acervo Mesoamericano.

Los resultados obtenidos a partir de cada una de las evaluaciones desarrolladas, fueron condensados mediante la aplicación de un análisis de correspondencia múltiple (ACM). Mediante éste análisis se pudo observar la distribución de todos los individuos incluidos en el estudio, así como la forma biológica a la cual pertenecían.

Con el ACM, se logró evidenciar el comportamiento global del complejo (Figura 30). En las gráficas tridimensionales obtenidas a partir del ACM, se puede observar la tendencia de los individuos silvestres (en color rojo) a formar un grupo bien definido en la parte derecha del plano cartesiano (Figura 30). Los individuos cultivados también se encuentran agrupados en la parte izquierda de la gráfica (en color azul), lo que indica una buena caracterización de éstos materiales, a partir de los marcadores evaluados. Los individuos intermedios representan la tendencia central de la gráfica y se encuentran muy cercanos a las formas silvestres, pero conservando cierta relación con las formas cultivadas.

El ACM mostró una diferenciación de 7 grupos, muy bien caracterizados en relación a la forma biológica de los individuos. Los individuos cultivados fueron divididos en dos grupos: el grupo 1 (26 individuos), agrupado por presentar una alta frecuencia del haplotipo C13 (37/45), el grupo 2 (12 individuos) (Figura 30), se separa de los demás cultivados por presentar una mayor frecuencia de lectinas M8, este patrón electroforético fue exclusivo del estatus biológico cultivado y de la población intermedia. Los individuos silvestres también fueron divididos en dos grupos, (grupo 3 y 4, Gráfica 30), el grupo 3 (3 individuos) se encuentra bastante diferenciado, principalmente por la presencia de alelos compartidos con la población intermedia.

Las formas biológicas intermedias, resultado de eventos de flujo génico, se dividieron en 3 grupos (grupos 5, 6 y 7), mostrando una fuerte tendencia al aislamiento de la tendencia

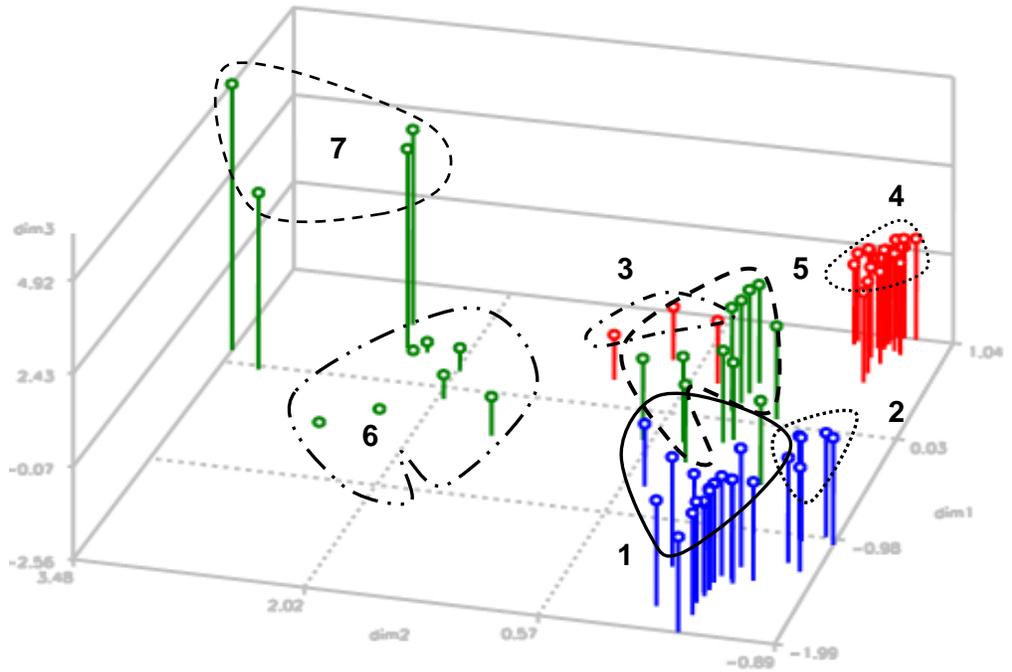
central, lo que puede explicarse por la presencia de alelos combinados en estas poblaciones (producto del intercambio de información genética entre silvestres y cultivados), presentes como heterocigotos y alelos exclusivos (no encontrados en silvestres o cultivados) en algunos individuos intermedios, tales alelos podrían estar reflejando procesos de recombinación dentro de esta población.

La distribución de las formas biológicas encontradas con éste análisis, sugiere que las formas intermedias son el producto de eventos de flujo de genes, lo que genera individuos con características compartidas entre silvestres y cultivados; además se infiere que algunos individuos se han diferenciado ampliamente dentro de la población intermedia; tal diferenciación puede estar directamente relacionada con procesos de recombinación genética.

Los microsatélites resultaron ser el marcador que más información aportó a la caracterización de los eventos de flujo de genes dentro del complejo, ya que permitieron establecer la presencia de alelos exclusivos de las formas silvestres y cultivadas, facilitando así la observación de alelos compartidos en la población con características intermedias (Tabla 14). A pesar de que *Phaseolus lunatus* presenta un sistema de reproducción principalmente autógamo, donde los alelos deberían mantenerse estables dentro de las poblaciones, en nuestro estudio se evidencia que ésto no se está cumpliendo, lo que indica que la polinización cruzada y por consiguiente el flujo de genes, son procesos inherentes a la dinámica de ésta especie para el acervo genético Mesoamericano.

Eventos de flujo génico fueron observados en un 100% (24/24) de los individuos evaluados dentro de la población intermedia. Una representación gráfica de 16 individuos intermedios, muestra cómo muchos de éstos alelos compartidos son generados a partir del flujo de genes entre silvestres y cultivados (Figura 31).

A.



B.

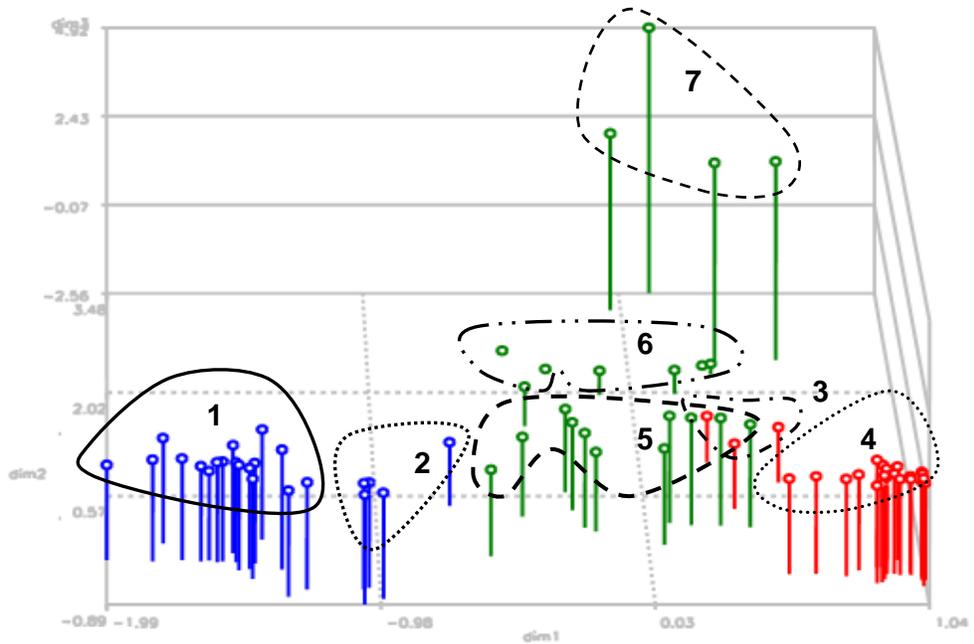


Figura 30. Distribución espacial de los individuos obtenida mediante el análisis de correspondencia múltiple; Individuos silvestres representados en color rojo. Individuos cultivados en color azul. Individuos intermedios en color verde. (A y B, representan dos vistas diferentes de la misma figura).

Tabla 14. Frecuencias de los alelos de microsatélites característicos de cada forma biológica dentro del complejo silvestre-intermedio-cultivado de *Phaseolus lunatus*. En azul

Estatus Biológico	BM 143	BM 156	BM 212	BM 153	BM 146	AG1	BM 183	BM 181	BM 202	BM 170	GATS 91	BM 140	BM 211	BM 141	BM 154	BM 155
Silvestre N = 30	150 (20)		198 (2)	205 (24)	272 (28)		150 (30)		152 (24) 156 (4)	172 (3) 180 (1)		164 (2) 168 (9)	210 (6) 220 (2)		190 (2) 192 (12)	144 (2)
Intermedio N = 24	150 (4)	224 (15)	198 (2)	205 (4)	272 (9) 278 (5) 280 (4)	153 (21)	144 (18) 150 (6)	178 (4)	146 (7) 152 (5) 156 (2)	172 (10) 180 (1)	216 (12)	164 (6) 168 (3)	202 (5) 210 (3) 220 (3)	170 (5) 174 (7) 178 (4)	190 (3) 192	144 (2)
Cultivado N = 45		224 (37)			278 (38) 280 (3)	153 (45)	144 (45)	178 (34)	146 (37)		216 (2)		202 (8)	170 (4) 174 (20) 178 (9)		

alelos exclusivos de individuos silvestres. En rojo alelos exclusivos de cultivados

Además, se observaron individuos donde se hallaron alelos de microsatélites combinados, donde se observa la presencia de un alelo exclusivo de material cultivado y otro típico de individuos silvestres en un *locus* determinado, lo que podría sugerir un cruce de material silvestre con polen de material cultivado o viceversa (González-Torres, 2004). Estos mismos individuos presentaron tamaños intermedios (representados como el peso en gramos de 100 semillas), que muestran la variación de éste marcador entre las formas cultivadas y silvestres (Figura 31). Otro aspecto de interés, es la posibilidad de que los alelos que se observan como compartidos o combinados en los individuos intermedios, pueden estar sufriendo procesos de introgresión genética. Tal incorporación de material puede ser el resultado de eventos de flujo de genes, que se han repetido en el tiempo. Teniendo en cuenta que del cruce entre individuos cultivados y silvestres se espera según las leyes de Mendel, una combinación de genomas transmitidos vía polen, que puede ser evidenciada mediante marcadores nucleares (González-Torres, 2004).

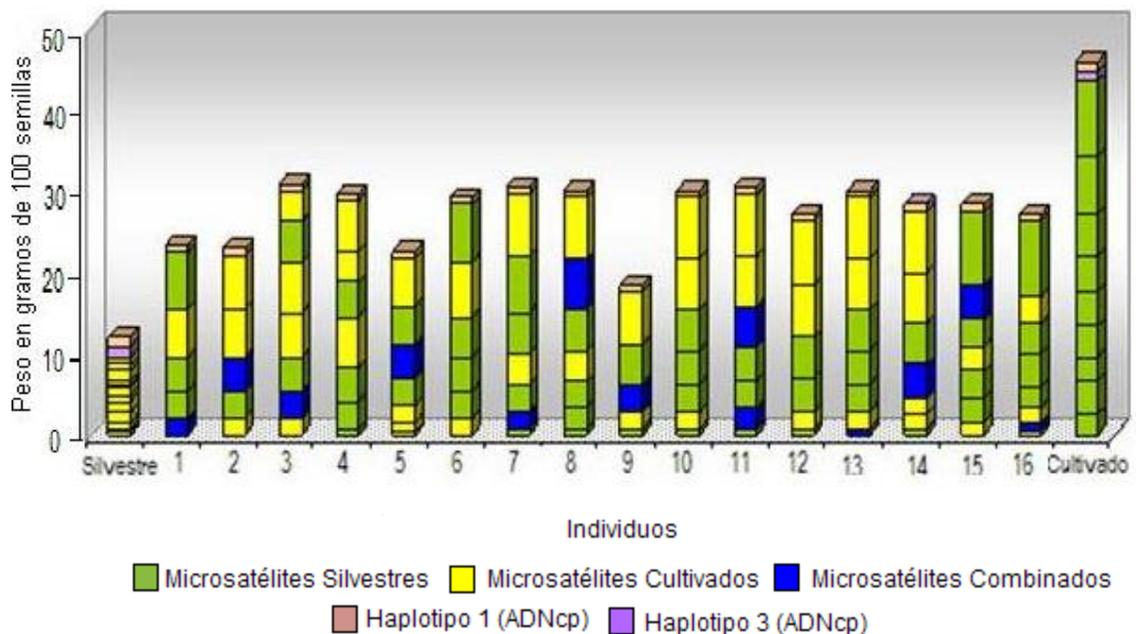


Figura 31. Representación gráfica de 16 individuos con características intermedias, para 3 de los marcadores evaluados (Tamaño de la semilla, ADN cp y microsatélites). Individuos: 1. IL1698; 2. IL1699; 3. IL1700; 4. IL1701; 5. IL1703; 6. IL1704; 7. IL1705; 8. IL1706; 9. IL1707; 10. IL1710; 11. IL1711; 12. IL1712; 13. 1713; 14. IL1714; 15. IL1716 y 16. IL1717. El tamaño de cada bloque esta relacionado con el número de pares de bases del microsatélite.

La dirección del flujo de genes fué obtenida a partir del análisis del genoma nuclear, mediante el programa ADMIX_1.0 (http://www.unife.it/genetica/Giorgio/giorgio_soft.html), utilizando el estimador $m\gamma$ (Bertorelle y Excoffier, 1998).

Encontrando que el flujo de genes en las poblaciones evaluadas es asimétrico y se presenta 1,4 veces más de silvestres a cultivados, que en el sentido contrario. Este resultado contrasta por lo obtenido por Martínez-Castillo *et al* (2007), donde reportan que el flujo de genes para *Phaseolus lunatus* en la península de yucatán, es 3 veces mayor de cultivados a silvestres. Estos mismos autores sugieren que la dirección observada en us estudio está influenciada por el intercambio de semillas domesticadas entre agricultores de la región.

Las diferencias encontradas en ambos trabajos seguramente están relacionadas directamente con las poblaciones estudiadas y los marcadores evaluados. Pero podrian estar mostrando una tendencia relacionada con un aumento del flujo génico de cultivados

a silvestres en el tiempo. Debido a que las poblaciones utilizadas en éste trabajo fueron colectadas en 1979, época en la cual las poblaciones silvestres se encontraban con mayor frecuencia cerca de los cultivos. Lo anterior, sustentado en que desde hace 30 años se ha presentado una intensificación de la agricultura, en la península de Yucatán, implicando una reducción en las especies silvestres que rodean las tierras cultivadas y un incremento progresivo en el uso de agroquímicos (López-Forment, 1998; Martínez-Castillo *et al*, 2007). Esta disminución en las poblaciones silvestres también está asociada a la degradación de los ecosistemas y al aumento de la frontera agrícola (Hernandez-Bermejo y Leon, 1992), así como al crecimiento de la ocupación humana, que genera un impacto directo sobre el mantenimiento de la diversidad.

Observándose una relación directa entre la dirección del flujo de genes y la degradación de los ecosistemas cercanos a las áreas de cultivo, aspecto que aplica para muchas otras especies domesticadas y sus relativos silvestres. Otro aspecto ligado a la dirección encontrada (de silvestre hacia cultivado) es la selección de los agricultores en búsqueda de semillas más lucrativas, lo que hace que el flujo de genes no sea tan exitoso en la dirección contraria, a pesar de la distribución simpátrica de poblaciones silvestres y cultivados (González-Torres, 2004). Tal selección de semillas puede estar dirigida hacia las formas intermedias, que presentan características poco deseables para los agricultores, como variaciones en el tamaño, formas irregulares, colores variables respecto a los encontrados en formas cultivadas y posiblemente la presencia de glucosidos cianogénicos. Debido a que tanto las formas silvestres, como las cultivadas presentan niveles bastante altos de estos compuestos, lo que puede generar problemas de digestibilidad para los consumidores, cambios en el sabor de las semillas o incluso intoxicaciones. Lo que aumenta las posibilidades de que las poblaciones silvestres se vean diezmadas cerca de los cultivos de frijol lima. Tendencia que puede verse en los resultados obtenidos en este trabajo que demuestran un flujo asimétrico, pero con una diferenciación muy baja entre ambas direcciones. Este comportamiento refleja la complejidad y el gran número de aspectos que deben ser tenidos en cuenta para la evaluación del flujo de genes en una especie como *Phaseolus lunatus*, donde es crucial integrar las variables metodológicas, biológicas, agrícolas, sociales, culturales y ambientales para generar información específica y que refleje la realidad en un tiempo y espacio determinado.

Debido a los resultados obtenidos en este trabajo se hace necesario comprender de manera integral la dinámica de las poblaciones de frijol lima, las cuales pueden estar reflejando características ecológicas y culturales especiales en ésta región. Generándose una pérdida en la diversidad de formas silvestres de *Phaseolus lunatus*. Aspecto que debe ser tenido en cuenta en las evaluaciones y en el monitoreo de los transgénicos que puedan ser liberados en un área específica. Principalmente en sitios de interés como la península de Yucatán, que representa unos de los centros de origen y diversidad más importantes del mundo.

5.7 CARACTERIZACIÓN Y FLUJO DE GENES EN LOS ACERVOS GENÉTICOS DE *Phaseolus lunatus* L.

Mediante la información obtenida de las evaluaciones con diferentes marcadores para el acervo genético Mesoamericano, se realizó una caracterización y evaluación de posibles eventos de flujo genético con los datos disponibles para el acervo Andino, tales datos fueron obtenidos siguiendo las mismas metodologías utilizadas en este estudio por Martínez-Garay (2007). Mediante un análisis de correspondencia múltiple se evaluó la estructura poblacional de ambos acervos, encontrando una amplia caracterización y diferenciación a nivel morfoagronómico, bioquímico y molecular (Figura 32).

La caracterización morfoagronómica fué bastante discriminativa entre los dos acervos, ya que las características de color, peso en gramos de 100 semillas y forma son altamente divergentes (Figura 33).



Figura 33. Comparación morfológica entre los complejos evaluados para cada acervo; A. Silvestre, B. Intermedio, C. Cultivado (Mesoamericano; D. Silvestre, E. Intermedio, F. Cultivado (Andino).

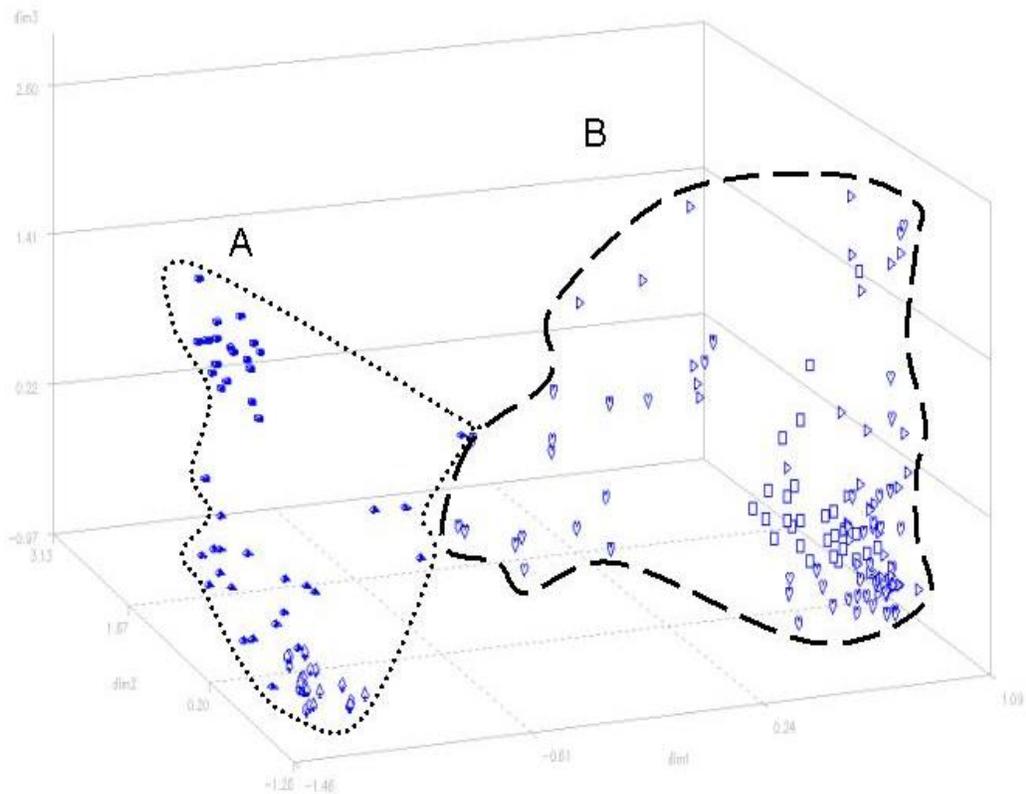


Figura 32. Gráfica de ACM donde se muestra la distribución de los individuos de *P. lunatus* de los dos acervos. (A) Acervo Mesoamericano; (B) Acervo Andino.

Los microsatélites aportaron información importante para la diferenciación de los dos acervos. Obteniéndose una caracterización de ambos acervos genéticos mediante la integración de metodologías que no habían sido utilizadas hasta ahora para ese fin (Tabla 15).

En cuanto a los patrones electroforéticos de proteínas se obtuvieron marcadas diferencias, encontrándose únicamente los de tipos M para el acervo Mesoamericano y los de tipo A para el acervo Andino (Figura 34).

Tabla 15. Alelos encontrados como exclusivos para cada uno de los acervos genéticos de *Phaseolus lunatus*.

MICROSATELITES														
ACERVO	AG1	BM 143	BM 170	BM 141	BM 211	BM 154	BM 201	BM 181	BM 156	GATS 91	BM 153	BM 212	BM 202	BM 140
ANDINO	155	143 147 149	162 164	176 180 184	214	186 198 212	92	181	216	230 244	190 200	204 206 208		
MESO-AMERICANO	145 157	145 152	158 172 176 180	168 170	180 202 210 216	190	98	174					156	160 174 176

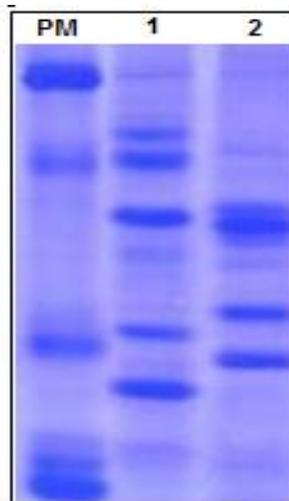


Figura 34. Patrones de proteínas obtenidos para los acervos Mesoamericano y Andino: PM, Marcador de Peso; 1. Patron característico Mesoamericano; 2. Patron característico Andino.

Un aspecto observado por Martínez-Garay (2007), fue la posibilidad de intercambio de genes entre ambos acervos genéticos de frijol lima. Este resultado es el producto de la información obtenida de una de las poblaciones evaluadas para el acervo Andino. Esta población corresponde a la accesión G25943 y hace parte de las formas cultivadas incluidas en el estudio (Figura 35).

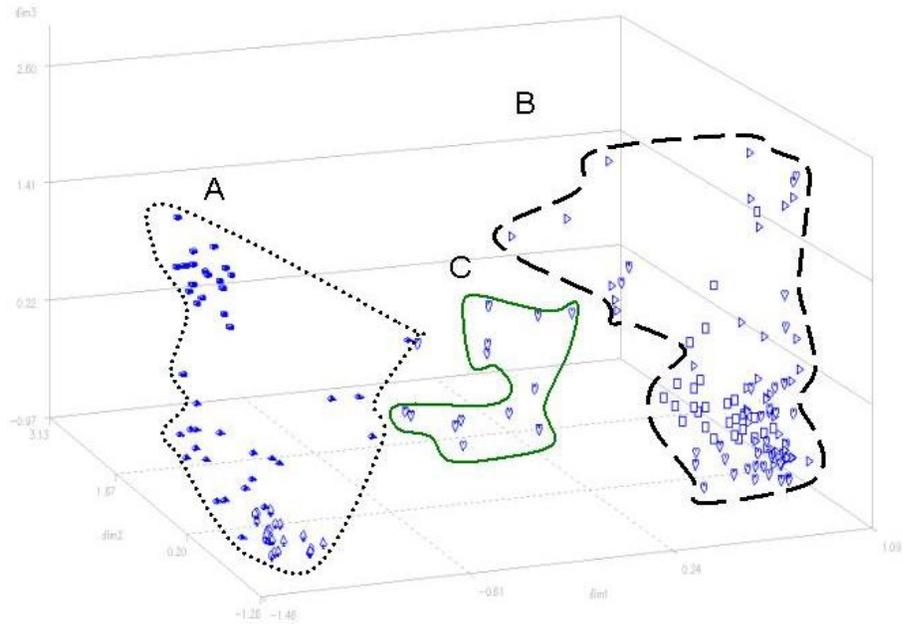


Figura 35. Analisis de ACM donde se muestra la distribución de la población G25943 (C) con respecto a los acervos Mesoamericano (A) y Andino (B) de *P. lunatus*.

La similitud que mostró esta población, en cuanto a sus patrones de restricción de cloroplastos y a algunos alelos de microsatélites, junto con su bajo tamaño de semilla (40.9 g/100 sem, similar a los reportados para el acervo Mesoamericano) con los datos obtenidos para el acervo Mesoamericano indican su origen se dio en este acervo o que es producto de la combinación de germoplasma de los dos acervos (Martinez-Garay).

6. CONCLUSIONES

Dentro del complejo evaluado, para el modelo *Phaseolus lunatus*, se evidenció de manera clara la presencia de fenómenos de flujo de material genético, lo que se hace evidente en todos los individuos de la población intermedia, los cuales exhiben un gran número de características combinadas producto de procesos de hibridización.

La principal dirección de flujo de genes se presentó desde materiales silvestres hacia poblaciones cultivadas, pero existe también un importante porcentaje de flujo genico en la dirección contraria.

La integración de marcadores morfoagronómicos, bioquímicos y moleculares, resultó ser de gran ayuda para la caracterización de las diferentes formas biológicas y por consiguiente para la evaluación de eventos de flujo de genes.

La concentración de glucósidos cianogénicos puede ser utilizado como un marcador bioquímico, bastante discriminativo para las formas silvestres y cultivadas. Además, es un rasgo que al parecer esta directamente influenciado por el flujo de genes, presentando altas concentraciones y variabilidad en las poblaciones híbridas producto del flujo de genes, lo cual tiene importantes implicaciones prácticas en la agricultura.

La evaluación del flujo de genes en poblaciones naturales, puede ser de gran utilidad para comprender la dinámica de las poblaciones, en relación a los efectos reales de la liberación de transgénicos.

El tiempo que ha transcurrido para que tengan lugar eventos de flujo de genes en este complejo de *Phaseolus lunatus*, es difícil de establecer, ya que las formas evaluadas pertenecen a poblaciones naturales, de las cuales no existe información sobre su estado generacional o su historia evolutiva.

La comparación de los resultados obtenidos para el Acervo Andino con los observados para el Acervo Mesoamericano, diferencian claramente las poblaciones, confirmando la

presencia de estos dos acervos para las formas cultivadas y silvestres de *Phaseolus lunatus*.

Existe la presencia en una baja frecuencia de evidencia que soporta el flujo de genes entre acervos, principalmente entre formas cultivadas. Algunos de las introgresiones del acervo Mesoamericano en el Andino podrian haberse dispersado hacia algunos individuos intermedios.

7. RECOMENDACIONES

Debido a la presencia de eventos de flujo de genes dentro de éste complejo de frijol Lima, se recomienda dirigir los futuros estudios hacia temáticas relacionadas con el monitoreo de las poblaciones y de su diversidad, así como la implementación de programas de bioseguridad alimentaria.

Teniendo en cuenta la importancia de las especies silvestres y los posibles impactos que podrían tener los organismos transgénicos sobre la diversidad presente en uno de los centros de origen y diversidad más importantes del mundo, se hace necesario establecer políticas claras sobre el control y evaluación de éstos organismos.

8. BIBLIOGRAFIA

- Arango. I. P. 1997. Contribución al Estudio de la Diversidad del Frijol Lima (*Phaseolus lunatus* Linneaus, Fabacea) en Colombia. Tesis. Universidad de Antioquia, Departamento de Biología. Medellín.
- Arias, D.M., y L.H. Rieseberg. 1994. Gene flow between cultivated and wildsunflowers. *Theor Appl Genet* 89:655-660.
- Ballesteros, G. A. 1999. Contribuciones al conocimiento del frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L.) en America tropical. Ph.D. disertación, colegio de postgraduados. Montecillos. Estado de México.
- Ballhorn. D. J., Lieberel. R., y Ganzhorn. J. U. 2005. Plant cyanogenesis of *Phaseolus lunatus* and its relevance for herbivore-plant interaction: the importance of quantitative data. *Journal of Chemical Ecology*. Vol. 31, Nº 7.
- Bartsch. D., S. Driessen, A. Gathmann, A. Hoffmann, M. Lehnen, T. Muecher, C. Saeglitz, U. Wehres y I. Schuphan. 2002. Monitoring the Environmental Consequences of Gene Flow from Transgenic Sugar Beet. Scientific Methods Workshop: Ecological and Agronomic Consequences of Gene Flow from Transgenic Crop to Wild Relatives. (*Meeting Proceedings*). The Ohio State University, pp. 78-93.
- Bartsch, D., y Schmitz, G. 2002. Recent Experience with Biosafety Research and Role of Post-market Enviromental Monitoring in Risk Management of Plant Biotechnology Derived Crops. In: J. Thomas y R. Fuchs (Eds.) *Biotechnology and Safety Assessment 3 rd Edition*. Academic Press.
- Baudet, J. C. 1977. The taxonomic status of the cultivated types of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Tropical Grain Legume*, 7:29-30.
- Baudoin, J. P. 1988. Genetic Resource, domestication and evolution of Lima bean, *Phaseolus lunatus*. In: Gepts (Ed.) *Genetics Resources of Phaseolus Beans*. Kluwer Academic Publishers, Dorthrecht, the Netherlands.
- Baudoin, J. P., Barthelemy, J. P., Agneessens, R., y Maquet, A. 1989. Evaluation of cyanide contents in the primary gene pool of the lima bean, *Phaseolus lunatus* L. *Bean Improvement Cooperative (BIC)*, Vol. 32.
- Baudoin, J. P., Barthelemy. J. P., y Ndungo. V. 1991. Variability of cyanide contents in the primary and secondary genepools of the lima bean, *Phaseolus lunatus* L. *FAO/IBPGR, Plant Genetic Resources Newsletter*, 85 :5-9.
- Baudoin, J. P. 1991. La culture et l' amelioration de la legumineuse alimentaire *Phaseolus lunatus* L. en zones tropicales. *Communaute Francaise de Belgique*, Faculte Des Sciences Agronomiques De Gembloux, pp. 10-15.

Baudoin, J. P., Degreef, O. Hardy, F. Janart, & I. Zorro Bi. 1998. Development of an *in situ* Conservation Strategy for limon bean (*Phaseolus lunatus* L.) Populations in the Central Valley of Costa Rica, p. 417-426. In S. J. Owens and P. J. Rudall (ed.) Reproductive biology, Royal Botanic Garden Press, Kew, England.

Beebe. S., Toro Ch. O., Gonzalez. A. V., Chacon M. I., y Debouck D. G. 1997. Wild-Weed-Crop Complexes of Common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) in the Andes of Peru and Colombia, and their Implications for Conservation and Breeding. Genetic Resources and Crop Evolution 44: 73-91.

Becerra, V., y Gepts, P. 1994. RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in its centres of origin. Genome 37: 253-263.

Becerra, V., y Paredes, M. 2000. Uso de Marcadores Bioquímicos y Moleculares en Estudios de Diversidad Genética. Agricultura Técnica, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA (Chile), Vol. 60 N° 3, pp. 270-281.

Bertorelle. B., y Excoffier. L. 1998. Inferring admixture proportion from molecular data. Mol. Biol. Evol. 15:1298-1311.

Birky, Jr, C. W. 2001. The Inheritance of Genes in Mitochondria and Chloroplasts: Laws, Mechanisms, and Models. Annu. Rev. Genet. 35: 125-148.

Caicedo, A. L., E. Gaitan, M. C. Duque., O. Toro Chica., D. G. Debouck y J. Tohme. 1999. AFLP fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and Related Wild Species from South America. Crop. Science. 39: 1497-1507.

Chambers, G., y McAvoy, E. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *In: Comparative Biochemistry and Physiology*. N° 126., p. 455-476.

Chandran, K. y S.M. Pandya. 2000. Morphological characterization of *Arachis* species of section *Arachis*. Plant Genet. Res. News. 121: 38-41.

Chacón. M. I. 2001. Chloroplast DNA Polymorphisms and the Evolution and Domestication of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis. University of Reading. School of Plant Sciences.

Chacón. M. I. Pickersgill. B., y Debouck. D. G. 2005. Domestication Patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean Cultivated races. Theor. Appl. Genet. 110:432-444.

Chen. L. J., Lee. D. S., Song. Z. P., Suh. H. S., y Lu. B. R. 2004. Gene Flow from Cultivated Rice (*Oryza sativa*) to its Weedy and Wild Relatives. Annals of Botany 93: 67-73

CLAYUCA. 2001. (Consortio latinoamericano y del Caribe para el apoyo a la investigación y desarrollo de la yuca. Nuevas opciones para la yuca. Continente Yuquero. (Cali) 3: 13.

Clegg. D. O., Conn. E. E., y Janzen. D. H. 1979. Developmental fate of the cyanogenic glucoside linamarin in Costa Rica wild lima bean seeds. *Nature*, Vol. 278, pp. 343-344.

Cooper, G. M., y Hausman, R. E. 2006. *La Célula*. Tercera Edición. Editorial Marban, cap. 120, pp. 120-122.

Debouck, D. G. 1979. Proyecto de Recolección de Germoplasma de *Phaseolus* en México, CIAT-INIA, 1978-1979. Unidad de Recursos Genéticos. Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Debouck, D. G., J. H. Liñan Lara, A. Campana Sierra & J. H. de la Cruz Rojas. 1987. Observations on the domestication of *Phaseolus lunatus* L. *FAO/IBPGR Plant Genetic Resources. Newsl.* 70: 26-32.

Debouck, D. G. 1988. *Phaseolus* germoplasm exploration. In: P. Gepts (Ed.), *Genetic Resources of Phaseolus Beans*, pp. 3-29, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

Debouck, D. G., Maquet. A., y Posso. C. 1989. Biochemical evidence for two different gene pools in lima beans, *Phaseolus lunatus* L. *Annu. Rep. Bean Improvement Coop.* 32: 58-59.

Debouck, D. G. 1999. Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean, p. 25-52. In: S. P. Singh (Ed.) *Common bean improvement in the twenty-first century*. Kluwer Academia Publishers, Dordrecht, Holland.

Domínguez. R., Jacobo. J. y Alemán R. 2002. El Uso del Fríjol Reina o Chilipuca (*Phaseolus lunatus*) en la Región Occidental de Honduras. *Noticias Sobre Cultivos de Cobertura. Boletín* N° 13. (CIDICCO, Centro Internacional de Información sobre Cultivos de Cobertura), pp. 1-8.

Ellstrand. N. C., Prentice. H. C., y Hancock. J. F. 1999. Gene Flow and Introgresión from Domesticated Plants into Theirs Wild Relatives. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 30:539-563.

Esquivel. M., Catiñeiras. L., y Hammer. K. 1990. Origin, classification, variation and distribution of lima bean (*Phaseolus lunatus*) in the Light of Cuban material.

Ferreira, M y Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el analisis genético. Brasilia: EMBRAPA, p. 30.

Francisco. I. A., y Pimenta. M. H. 2000. Cyanogenic glycosides in plants. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Vol.43, N° 5, pp. 487-492.

Fofana. B., J. P. Baudoin., X. Vekemans., D. G. Debouck, y P. du Jardin. 1999. Molecular evidence for an Andean origin and a secondary gene pool for the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) using chloroplast DNA. *Theor Appl Genet.* 98: 202–212

Futuyma. D. J. 1998. *Evolutionary Biology*, Third Edition, Chapter 11, pp. 314-315. Sinauer Associates, Inc.

- Gaitán-Solís. E., Duque. M. C., Edwards. K. J., y Tohme. J. 2002. Microsatellite Repeats in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, Characterization, and Cross-Species Amplification in *Phaseolus ssp.* *Crop Science*. 42: 2128-2136.
- Gepts. P. y Papa. R. 2003. Possible Effects of (Trans) Gene Flow from Crops on the Genetic Diversity from Landraces and Wild Relatives. *Environm. Biosafety Res.* 2: 89-103.
- González-Torres. R. I. 2004. Estimación del Flujo de Genes en *Phaseolus vulgaris* L. Mediante Marcadores Moleculares: Microsatélites y Polimorfismos de Cloroplasto. Tesis. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias (Maestría en Microbiología).
- Gonzalez, R. I., Gaitan, E., Duque, M. C., Toro, O., Ocampo, C.H., Tohme, J., y D. G. Debouck. 2003. Monitoring gene flow between wild relatives and landraces of common bean in Costa Rica. *Annu. Rept. Bean Improvement Coop. (USA)* 46:1-2.
- Gonzalez, R. I., Gaitan, E., Araya, R., Toro, O., Tohme, J., y D. G. Debouck. 2004. Additional evidence on gene flow events in *Phaseolus vulgaris* in Costa Rica. *Annu. Rept. Bean Improvement Coop. (USA)* 47:167-168.
- Guimaraes, E. 2003. Mejoramiento poblacional, una alternativa para explorar los recursos genéticos del arroz en América Latina. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), p. 50.
- Gutierrez-Salgado, A., Gepts, P., y Debouck, D. G. 1995. Evidence for two gene pools of Lima bean, *Phaseolus lunatus* L. In the Americas. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 42:15-28.
- Hamrick. J. L., Godt Mary Jo W. y Sherman Boyle Susan L. 1995. Gene Flow Among Plant Populations: Evidence from Genetic Markers. *Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics*. P. C. Hoch and A. G. Stephenson (Eds.), Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, pp. 215-232.
- Haque, M. R., y Bradbury, J. H. 2002. Total cyanide determination of plants and foods using the picrate and acid hydrolysis method. *Food Chemistry*. 77:107-114.
- Hardy. O., Dubois. I., Zorro. Bi., y J. P. Baudoin. 1997. Gene Dispersal and its Consequences on the Genetic Structure of Wild Population of Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) in Costa Rica. *Plant Genetic Reso. Newsl.* N° 109: 1-6.
- Hernandez-Bermejo. J. E, y León J. 1992. Cultivos marginados, otra perspectiva de 1942. FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Hoc. P. S., Espert. S. M., Drewes. S. I., y Burghardt. A. D. 2003. Polimorfismo en *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* (Fabaceae). Evidencias que indican hibridación natural. *Rev. Biol. Trop.* 51(3): 725-736
- Hoelzel, A. R. 1998. *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. Second Edition. Oirl Press. Oxford University Press, pp. 237.

- Hughes. M. A., y Stirling. J. D. 1982. A study of dominance at the locus controlling cyanoglucoside production in *Trifolium repens* L. *Euphytica* 31: 477-483.
- Jenczewski. E., Prosperi. J. M., y Ronfort. J. 1999. Evidence for gene flow between wild and cultivated *Medicago sativa* (Leguminosae) based on allozyme markers and quantitative traits. *American Journal of Botany*.86: 677-687.
- Kay, D. E. 1979. Food Legumes. TPI, Crop and Product Digest. Nº 3. Edit. Tropical Products Institute, pp. 224-244.
- Kakes. P.1990. Properties and functions of the cyanogenic system in higher plants. *Euphytica* 48: 25-43.
- Klinger, T., D.R. Elam, y N.C. Ellstrand. 1991. Radish as a model system for the study of engineered gene escape rates via crop-weed mating. *Conserv Biol* 5:531-535.
- Langevin, S., K. Clay, and J.B. Grace. 1990. The incidence and effects of hybridization between cultivated rice and its related weed red rice (*Oryza sativa* L.). *Evolution* 44:1000-1008.
- Liener, I. V. 1969. Toxic constituents of plant foodstuffs. Department of biochemistry, Universidad de Minnesota. Academic Press. New York and London.
- Lioi, L., Esquivel. M., Castañeiras y Hammer. K. 1991. Lima bean (*Phaseolus lunatus*) landraces from Cuba: electrophoretic analysis of seed storage proteins. *Biol. Zent. Bl. Heft*. 1:76-79.
- Lioi, C. Lotti. y I. Galasso. 1998. Isozyme diversity, RFLP of the rDNA and Phylogenetic affinities among cultivated lima beans, *Phaseolus lunatus* (*fabaceae*). *Plant Systematic and Evolution*, 213: 153-164.
- Lioi, L., Sparvoli, F., Bollini, R. 1999. Variation and Genomic Polymorphism of Lectin-related Proteins in Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) seeds. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46: 175-182.
- Lioi, L., y I. Galasso. 2002. Oligonucleotide DNA fingerprinting revealing polymorphism in *Phaseolus lunatus* L. *Genetic Resources and Crop Evolution* 49: 53-58.
- Lopez-Formet. I.S. 1998. Changes in Diversity in the Process of Milpa Intensification in the Henequen Zone in Yucatan, Mexico. Ohio State University, PROTROPICO – Universidad Autonoma de Yucatan.
- Mangelsdorf, P. C., y G. S. Frads. 1931. A direct quantitative relationship between Vit A in command and the number of genes for yellow pigmentation. *Science* 73: 241-242.
- Mahuku. G, S. 2004. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 71-81

- Maquet. A. I., Gutiérrez. A., y Debocuk. D. G. 1990. Further biochemical evidence for the existence of two gene pools in lima beans. *Bean Improvement Cooperative (BIC)*, 33, pp. 128-129.
- Maquet. A. I. 1991. Lima bean (*Phaseolus lunatus*), Catalogo. Documento de trabajo N° 84. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Unidad de Recursos Genéticos. (CIAT-Glemboux Project).
- Maquet. A. 1995. Study on Genetic Diversity of the legume *Phaseolus lunatus* using morphophysiological and Protein markers. These de Doctorat. Glemboux, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, Belgium, 188 p.
- Maquet, A., y J. P. Baudoin. 1997. Aperçu de la distribution neotropicale de *Phaseolus lunatus*, *Belgian Journal of Botany*, 130:93-116.
- Maquet. A., Zoro. I., Rocha. O. J., y Baudoin. J.P.1996. Case Studies on Breeding Systems and its Consequences for Germplasm conservation. *Genetic Resources and Crop Evolution* 43: 309-318.
- Maquet. A., Masumbuko. B., Ouedraogo. M., Irie. Z. Bi., y Baudoin. J. P. 2001. Estimation of Gene Flow Among Wild Populations of *Phaseolus lunatus* L. Using Isozyme Markers. *Bean Improvement Cooperative (BIC)*, 44, pp. 27-28.
- Martinez-Castillo, J., Zizumbo-Villareal, D., Perales-Rivera, H., y Colunga-GarciaMarin, P. 2003. Intraspecific diversity and morpho-phenological variation in *Phaseolus lunatus*
- Martinez-Castillo, J., Zizumbo-Villareal, D., Gepts, P., Delgado-Valerio, P, y Colunga-GarciaMarin, P. 2006. Structure and Gene Diversity of Wild Populations of Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) from de Yucatán Peninsula, Mexico. *Crop Sci.* 46:1071-1080.
- Martinez-Castillo, J., Zizumbo-Villareal, D., Gepts, P. y Colunga-GarciaMarin, P. 2007. GeneFlow and Genetic Structure in the Wild-Weedy-Domesticated Complex of *Phaseolus lunatus* L. inits Mesoamerican Center of Domestication and Diversity. *Crop Sci.* 47:58-66.
- Martinez-Garay. C. A. 2007. Evaluación del flujo de genes entre poblaciones cultivadas y silvestres de frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) mediante marcadores bioquímicos, morfoagronómicos y moleculares. [*En prensa*].
- Montgomery. R. D. 1965. The medical significance of cyanogens in plant foodstuffs. *American Journal of Clinical Nutrition*. Vol. 17.
- Nayer. J. K., y Fraenkel. G. 1963. The chemical basis of the host selection of the Mexican bean beetle *Epilachna varivestis*. *Ann. Ent. Soc. Am.* 56: 174-178.
- Neal. S. C., Halfhill. M. D., y Warwick. S. I. 2003. Transgene Introgression from Genetically Modified Crops to Their Wild Relatives. *Nature.* 4:806-817.

Papa, R. y Gepts, P. 2003. Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. *Theor. Appl. Genet.* 106:239–250.

Roa, A. C., P. Chavarriaga-Aguirre, M. C. Duque, M. M. Maya, M. Bonierbale, C. Iglesias & J. Tohme. 2000. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. *American Journal of Botany* 87(11): 1647-1655.

Rocha. O., Macaya.G., y Baudoin. J.1997. Causes of local extinction and recolonization, determined by 3 years of monitoring wild populations of *Phaseolus lunatus* L., in the Central Valley of Costa Rica. *Plant Genet. Res. News.* 112:44-48.

Rocha. O., Degreff. J., Barrantes. D., Castro. E., y Macaya. G..2002. Metapopulation dynamics of lima beans (*Phaseolus lunatus* L) in the Central Valley of Costa Rica. In J.M.M. Engels, A.H.D. Brown & M.T. Jackson (eds.). *Managing Plant Genetic Resources.* CABI International UK.

Sanchez. T. 2006. Un Nuevo cromogeno para la determinacion de cianogenicos en productos de yuca. Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Seigler. D. S., Maslin. R. B., y Conn. E. E. 1989. *Advanced in Legume Biology (Cyanogenesis in the Leguminosae).* Monogr. Syst. Bot. Gard. 29:645-672.

Slatkin. M. 1987. Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. *Science*, 236:787-792.

Stewart. Jr. C. N., Halfhill. M. D. y Warwick. S. I. 2003, Transgene Introgression from Genetically Modified Crops to theirs Wild Relatives. *Nature Reviews.* Vol, 4., pp. 806-817.

Summerfield, R. J., y Robert, E. H. 1985. *Grain Legume Crops.* Edit. Collins, pp. 477-519.

Upton. J. L., Fiscal. V. V., Mata. J. J., Herrera. C. A., y Hernandez J. J. 2001. Hibridación Natural entre *Pinus oocarpa* y *Pinus pringlei*. *Acta Botanica Mexicana.* 57:51-66.

USDA, ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network - (GRIN)* [Base de Datos en Línea]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?27591> (02 December 2006).

Vanderborcht. T. 1979. Le dosage de l' acide cyanhydrique chez *P. lunatus* L. *Annales de Gembloux*, 85:29-41

Vargas. E. M., Macaya G., Baudoin. J. P., y Rocha. O.J.2001. Cases studies in breeding systems and its consequences for germoplasm conservation: Electrophoresis mobility of phaseolins in wild populations of lima beans (*Phaseolus lunatus* L) in the Central Valley of Costa Rica. *Genet. Res. Crop. Evol.* 48:109-120.

Vargas. E. M., Castro. E., Macaya. G. , y Rocha. O. J. 2003. Variación del tamaño de frutos y semillas en 38 poblaciones silvestres de *Phaseolus lunatus* (Fabaceae) del Valle Central de Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 51 (3-4):707-724.

Wang, Z.Y.; Second, G. and Tanskley, S.D. 1992. Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs. Theor. Appl. Genet. 83:565-581

Webster, B. D., S. P. Lynch y C. L. Tucker. 1979. A morphological study of the development or reproductive structures of *Phaseolus lunatus* L. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 104(2) : 240-243.

Yañez-Amayo, B. V. 2002. Aislamiento y Caracterización de Marcadores Moleculares Microsatélites a Partir de Librerías Genómicas Enriquecidas de Camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas. Lima-Perú, pp. 13-28.

Yu. K., Park. S. J., y Poysa V. 1999. Abundance and Variation of microsatellite DNA sequences in the bean (*Phaseolus* y *Vigna*). Genome. Vol. 42, pp. 27-34

Yu. K., Park. S. J., Poysa. V., Gepts. P. 2000. Integration of simple sequence repeats (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). The American Society Association 91:429-434.

ANEXOS

ANEXO A:

Datos de pasaporte de los individuos de *Phaseolus lunatus* incluidos en este estudio.

IL	NUMERO ACCESIÓN	ESTADO BIOLÓGICO	NOMBRE COMÚN	COLOR SEMILLA	PESO 100 SEMILLAS (g)	PAIS	ESTADO	MUNICIPIO	SITIO	ALTITUD (msnm)	LONGITUD	LATITUD
1559	G25704	Silvestre		Agouti	13,1	MEX	Jalisco	Zapotán	San Isidro	1390	10324W	2048N
1560	G25704	Silvestre		Agouti	14,1	MEX	Jalisco	Zapotán	San Isidro	1390	10324W	2048N
1561	G25704	Silvestre		Agouti	12,8	MEX	Jalisco	Zapotán	San Isidro	1390	10324W	2048N
1562	G25704	Silvestre		Agouti	14	MEX	Jalisco	Zapotán	San Isidro	1390	10324W	2048N
1563	G25704	Silvestre		Agouti	11,7	MEX	Jalisco	Zapotán	San Isidro	1390	10324W	2048N
1564	G25704	Silvestre		Agouti	12,4	MEX	Jalisco	Zapotán	San Isidro	1390	10324W	2048N
1565	G25704	Silvestre		Agouti	11,6	MEX	Jalisco	Zapotán	San Isidro	1390	10324W	2048N
1567	G25704	Silvestre		Agouti	15	MEX	Jalisco	Zapotán	San Isidro	1390	10324W	2048N
1568	G25704	Silvestre		Agouti	15,7	MEX	Jalisco	Zapotán	San Isidro	1390	10324W	2048N
1569	G25704	Silvestre		Agouti	14,7	MEX	Jalisco	Zapotán	San Isidro	1390	10324W	2048N
1570	G25704	Silvestre		Agouti	13,2	MEX	Jalisco	Zapotán	San Isidro	1390	10324W	2048N
1571	G25704	Silvestre		Agouti	14,8	MEX	Jalisco	Zapotán	San Isidro	1390	10324W	2048N
1572	G25704	Silvestre		Agouti	14,7	MEX	Jalisco	Zapotán	San Isidro	1390	10324W	2048N
1575	G25704	Silvestre		Agouti	14,5	MEX	Jalisco	Zapotán	San Isidro	1390	10324W	2048N
1576	G25704	Silvestre		Agouti	14,2	MEX	Jalisco	Zapotán	San Isidro	1390	10324W	2048N
1578	G25974	Cutivado	Chapaneca rosada	Café	55,4	GTM	Jalapa	San Luis J.	San Luis J.	750	08944W	1438N
1579	G25974	Cutivado	Chapaneca rosada	Café	51,4	GTM	Jalapa	San Luis J.	San Luis J.	750	08944W	1438N
1580	G25974	Cutivado	Chapaneca rosada	Café	51,2	GTM	Jalapa	San Luis J.	San Luis J.	750	08944W	1438N
1581	G25974	Cutivado	Chapaneca rosada	Café	63,2	GTM	Jalapa	San Luis J.	San Luis J.	750	08944W	1438N
1582	G25974	Cutivado	Chapaneca rosada	Café	53,3	GTM	Jalapa	San Luis J.	San Luis J.	750	08944W	1438N
1586	G25974	Cutivado	Chapaneca rosada	Café	59,3	GTM	Jalapa	San Luis J.	San Luis J.	750	08944W	1438N
1587	G25974	Cutivado	Chapaneca rosada	Café	67,3	GTM	Jalapa	San Luis J.	San Luis J.	750	08944W	1438N
1588	G25974	Cutivado	Chapaneca rosada	Café	61	GTM	Jalapa	San Luis J.	San Luis J.	750	08944W	1438N
1589	G25974	Cutivado	Chapaneca rosada	Café	64,9	GTM	Jalapa	San Luis J.	San Luis J.	750	08944W	1438N

1590	G25974	Cutivado	Chapaneca rosada	Café	63,4	GTM	Jalapa	San Luis J.	San Luis J.	750	08944W	1438N
1591	G25974	Cutivado	Chapaneca rosada	Café	70,6	GTM	Jalapa	San Luis J.	San Luis J.	750	08944W	1438N
1593	G25974	Cutivado	Chapaneca rosada	Café	62,9	GTM	Jalapa	San Luis J.	San Luis J.	750	08944W	1438N
1595	G25974	Cutivado	Chapaneca rosada	Café	64,2	GTM	Jalapa	San Luis J.	San Luis J.	750	08944W	1438N
1596	G25974	Cutivado	Chapaneca rosada	Café	72,2	GTM	Jalapa	San Luis J.	San Luis J.	750	08944W	1438N
1597	G25974	Cutivado	Chapaneca rosada	Café	66,2	GTM	Jalapa	San Luis J.	San Luis J.	750	08944W	1438N
1599	G25737	Silvestre	lb choh	Negro	14,5	MEX	Campeche	Hecelchakan	Cumpich	60	08955W	2013N
1600	G25737	Silvestre	lb choh	Negro	14,4	MEX	Campeche	Hecelchakan	Cumpich	60	08955W	2013N
1601	G25737	Silvestre	lb choh	Negro	13,2	MEX	Campeche	Hecelchakan	Cumpich	60	08955W	2013N
1602	G25737	Silvestre	lb choh	Negro	15	MEX	Campeche	Hecelchakan	Cumpich	60	08955W	2013N
1603	G25737	Silvestre	lb choh	Negro	15,3	MEX	Campeche	Hecelchakan	Cumpich	60	08955W	2013N
1604	G25737	Silvestre	lb choh	Agouti	13,2	MEX	Campeche	Hecelchakan	Cumpich	60	08955W	2013N
1606	G25737	Silvestre	lb choh	Agouti	17	MEX	Campeche	Hecelchakan	Cumpich	60	08955W	2013N
1607	G25737	Silvestre	lb choh	Agouti	14	MEX	Campeche	Hecelchakan	Cumpich	60	08955W	2013N
1608	G25737	Silvestre	lb choh	Agouti	14,5	MEX	Campeche	Hecelchakan	Cumpich	60	08955W	2013N
1609	G25737	Silvestre	lb choh	Agouti	15,9	MEX	Campeche	Hecelchakan	Cumpich	60	08955W	2013N
1610	G25737	Silvestre	lb choh	Agouti	11,3	MEX	Campeche	Hecelchakan	Cumpich	60	08955W	2013N
1611	G25737	Silvestre	lb choh	Agouti	12,9	MEX	Campeche	Hecelchakan	Cumpich	60	08955W	2013N
1612	G25737	Silvestre	lb choh	Agouti	15,6	MEX	Campeche	Hecelchakan	Cumpich	60	08955W	2013N
1613	G25737	Silvestre	lb choh	Agouti	16	MEX	Campeche	Hecelchakan	Cumpich	60	08955W	2013N
1614	G25737	Silvestre	lb choh	Agouti	16,3	MEX	Campeche	Hecelchakan	Cumpich	60	08955W	2013N
1621	G25789	Silvestre	lb choh	Agouti	17,1	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1619	G25789	Silvestre	lb choh	Agouti	15,1	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1622	G25789	Silvestre	lb choh	Agouti	12,7	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1624	G25789	Silvestre	lb choh	Agouti	15,5	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1626	G25789	Silvestre	lb choh	Agouti	12,9	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1627	G25789	Silvestre	lb choh	Agouti	10	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1628	G25789	Silvestre	lb choh	Agouti	15,8	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1629	G25789	Silvestre	lb choh	Agouti	14,8	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936N	1935W
1630	G25789	Silvestre	lb choh	Agouti	14,9	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N

1631	G25789	Silvestre	lb choh	Agouti	16	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1632	G25789	Silvestre	lb choh	Agouti	13,6	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1633	G25789	Silvestre	lb choh	Agouti	11,6	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1635	G25789	Silvestre	lb choh	Agouti	14,6	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1636	G25789	Silvestre	lb choh	Agouti	14,3	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1637	G25789	Silvestre	lb choh	Agouti	13,9	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1638	G25705	Cultivado	lb blanco munición	Agouti	38,2	MEX	Campeche	Hopelchen	Dzibalchen	120	08936W	1935N
1639	G25705	Cultivado	lb blanco munición	Blanco	43,2	MEX	Campeche	Hopelchen	Dzibalchen	100	08942W	1925N
1640	G25705	Cultivado	lb blanco munición	Blanco	35,3	MEX	Campeche	Hopelchen	Dzibalchen	100	08942W	1925N
1641	G25705	Cultivado	lb blanco munición	Blanco	39,5	MEX	Campeche	Hopelchen	Dzibalchen	100	08942W	1925N
1642	G25705	Cultivado	lb blanco munición	Blanco	38,5	MEX	Campeche	Hopelchen	Dzibalchen	100	08942W	1925N
1643	G25705	Cultivado	lb blanco munición	Blanco	42,1	MEX	Campeche	Hopelchen	Dzibalchen	100	08942W	1925N
1644	G25705	Cultivado	lb blanco munición	Blanco	36,2	MEX	Campeche	Hopelchen	Dzibalchen	100	08942W	1925N
1645	G25705	Cultivado	lb blanco munición	Blanco	38,3	MEX	Campeche	Hopelchen	Dzibalchen	100	08942W	1925N
1646	G25705	Cultivado	lb blanco munición	Blanco	41,3	MEX	Campeche	Hopelchen	Dzibalchen	100	08942W	1925N
1647	G25705	Cultivado	lb blanco munición	Blanco	37,5	MEX	Campeche	Hopelchen	Dzibalchen	100	08942W	1925N
1649	G25705	Cultivado	lb blanco munición	Blanco	35,4	MEX	Campeche	Hopelchen	Dzibalchen	100	08942W	1925N
1650	G25705	Cultivado	lb blanco munición	Blanco	43,8	MEX	Campeche	Hopelchen	Dzibalchen	100	08942W	1925N
1654	G25705	Cultivado	lb blanco munición	Blanco	37,6	MEX	Campeche	Hopelchen	Dzibalchen	100	08942W	1925N
1652	G25705	Cultivado	lb blanco munición	Blanco	49,8	MEX	Campeche	Hopelchen	Dzibalchen	100	08942W	1925N
1653	G25705	Cultivado	lb blanco munición	Blanco	47,8	MEX	Campeche	Hopelchen	Dzibalchen	100	08942W	1925N
1659	G25786	Cultivado	Chak ib	Blanco	44,1	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	100	08942W	1925N
1660	G25786	Cultivado	Chak ib	Morado	43,6	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1661	G25786	Cultivado	Chak ib	Morado	38,7	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1662	G25786	Cultivado	Chak ib	Morado	40,2	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1663	G25786	Cultivado	Chak ib	Morado	49,5	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1664	G25786	Cultivado	Chak ib	Morado	48	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1665	G25786	Cultivado	Chak ib	Morado	49,9	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1666	G25786	Cultivado	Chak ib	Morado	40	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1667	G25786	Cultivado	Chak ib	Morado	45,9	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N

1669	G25786	Cultivado	Chak ib	Morado	42,6	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1670	G25786	Cultivado	Chak ib	Morado	44,3	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1672	G25786	Cultivado	Chak ib	Morado	45,9	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1673	G25786	Cultivado	Chak ib	Morado	51,2	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1674	G25786	Cultivado	Chak ib	Morado	46,8	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1676	G25786	Cultivado	Chak ib	Morado	48,9	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1678	G25787	Cultivado		Morado	46,7	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1679	G25787	Cultivado		Café	41,2	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1680	G25787	Cultivado		Café	44	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1681	G25787	Cultivado		Café	40,9	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1682	G25787	Cultivado		Café	45,7	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1683	G25787	Cultivado		Café	46,4	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1684	G25787	Cultivado		Café	49	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1685	G25787	Cultivado		Café	37	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1686	G25787	Cultivado		Café	40,6	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1687	G25787	Cultivado		Café	45,2	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1691	G25787	Cultivado		Café	45,4	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1689	G25787	Cultivado		Café	41,6	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1693	G25787	Cultivado		Café	49,2	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1694	G25787	Cultivado		Café	49,3	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1695	G25706	Cultivado		Café	47,4	MEX	Campeche	Hopelchen	Vicente G.	120	08936W	1935N
1698	G25706	Intermedio	lb choh	Café	28,4	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	120	08936W	1935N
1699	G25706	Intermedio	lb choh	Negro	24,2	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
1700	G25706	Intermedio	lb choh	Negro	26,1	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
1701	G25706	Intermedio	lb choh	Negro	29,4	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
1702	G25706	Intermedio	lb choh	Negro	22,4	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
1703	G25706	Intermedio	lb choh	Café	24,8	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
1704	G25706	Intermedio	lb choh	Café	35,9	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
1705	G25706	Intermedio	lb choh	Café	27,6	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
1706	G25706	Intermedio	lb choh	Café	29,2	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N

1707	G25706	Intermedio	lb choh	Café	23,5	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
1708	G25706	Intermedio	lb choh	Café	25,7	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
1710	G25706	Intermedio	lb choh	Agouti	26,3	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
1711	G25706	Intermedio	lb choh	Agouti	23,1	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
1712	G25706	Intermedio	lb choh	Agouti	25,1	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
1713	G25706	Intermedio	lb choh	Agouti	26,7	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
1714	G25706	Intermedio	lb choh	Agouti	26,4	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
1715	G25706	Intermedio	lb choh	Agouti	23,6	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
1716	G25706	Intermedio	lb choh	Agouti	27,2	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
1717	G25706	Intermedio	lb choh	Agouti	23,8	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
1718	G25706	Intermedio	lb choh	Agouti	19	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
1719	G25706	Intermedio	lb choh	Agouti	23,7	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
1720	G25706	Intermedio	lb choh	Agouti	25,4	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
1721	G25706	Intermedio	lb choh	Agouti	22,1	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
				Agouti	19,4	MEX	Campeche	Hopelchen	Chichimuk	100	08942W	1925N
				Agouti						100	08942W	1925N

ANEXO B:

- Metodo de extracción de proteínas de semilla en frijol.

1. Escarificar $\frac{1}{2}$ o 1 semilla entera.
2. Deshidratar la semilla escarificada (1 hora a 45 °C con silica gel).
3. Macerar en seco la semilla deshidratada hasta obtener harina.
4. Pesar 50 mg de harina.
5. Agregar 500 μ l de solución extractora (relación 1:10; p/v)
6. Agitar 5 minutos.
7. Poner las muestras en ultrasonido con hielo y agua, durante 1 hora y a temperatura ambiente.
8. Centrifugar las muestras durante 20 minutos a 14.000 r.p.m.
9. Extraer sobrenadante (+/- 250 μ l).
10. Agregar +/- 250 μ l de buffer cracking (relación 1:1; v/v).
11. Agitar durante 2 minutos.
12. Poner las muestras en baño maría, durante 5 minutos.
13. Conservar a -14 °C.

- Soluciones para extracción de proteínas.

1. **Solucion Extractora** (Tris-HCl. 0.036 M; pH: 8.5; Volumen de 250 ml):

Reactivo	Cantidad
Trisma-base	1.09 g.
Trisma HCl	0.553 g.
Agua	100 ml.
Medir pH y ajustar volumen.	
NaCl 1% (p/v)	2.5 g.

Stock en Nevera.

2. **Buffer Cracking** (pH 6.8; Volumen 500 ml):

Reactivo	Cantidad
Trisma HCl 0.625 M, pH 6.8.	350 ml.
Mercaptoetanol	5 g.
Azul de Bromofenol	0.05 g.
SDS (lauril sulfato)	10 g.

Stock a temperatura ambiente (Bodega).

3. Solución de corrida para geles en una dimensión (electroforesis 1D-SDS-PAGE):

-Beffer de corrida Tris-Glicina (pH 8.3; Trisma base 0.031 M, Glicina 0.19 M; para un volumen final de 3 litros).

Reactivo	Cantidad
Glicina.	43.2 g.
Trisma base	9 g.
SDS 10 %	30 ml.
Agua	500 ml.
Completar volumen.	

4. Tinción para geles de una dimensión (electroforesis 1D-SDS-PAGE):

- Solució azul de coomasie (volumen 3 litros).

Reactivo	Cantidad
Azul de coomasie	7.5 g.
Metanol	1.362 ml.
Acido acético	276 ml.
Agua	1362 ml.

- Solucion para desteñido (volumen 20 litros).

Reactivo	Cantidad
Etanol	5.000 ml. (25%)
Acido acético	1.400 ml. (7 %)
Agua	500 ml.

- Preparación de geles en una dimension (electroforesis 1D-SDS-PAGE)

- Proteínas totales al 15 % (Camara protean II (16 cm)¹, para 2 geles grandes:

Reactivo	Cantidad
Acrilamida*	49.5 ml.
Agua	12.23 ml.
Buffer 8.8	12.23 ml.
SDS**	375 µl
Persulfato de amonio	375 µl
TEMED	37.5 µl

* Solución stock de acrilamida %T=22.8 y %C=2.63.

** Desgacificar 20 minutos.

¹ Los 74,3 ml de la solución resultante de mezclar acrilamida, agua, buffer 8.8 y SDS se dividen por igual (37,15 ml) para cada uno de los 2 geles y para llevar a cabo su polimerización se adiciona por cada gel, 188 µl de persulfato de amonio y 19 µl de TEMED.

ANEXO C:

Protocolo para la extracción de ADN total.

1. En un tubo eppendorf agregar 800 µl de buffer de extracción* de tejido (1 trifolio) y dejar en baño maria 1 hora a 65 °C.
2. Agitar el tubo y agregar 200 µl de Acetato de amonio 7.5 M, agitar y dejar por 15 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 12.000 r.p.m., por 15 minutos.
3. Transferir el sobrenadante y agregar 500 ml de cloroformo:octanol (24:1), mezclar bien y centrifugar a 12.000 r.p.m., por 10 minutos.
4. Transferir el sobrenadante y agregar ½ volumen de isopropanol frio y dejar precipitando en el congelador de un día para otro o minimo 2 horas.
5. Centrifugar a 12.000 r.p.m., por 15 minutos, eliminar el sobrenadante y lavar el pellet con 500 µl de etanol frio al 70 %.
6. Dejar evaporar totalmente el etanol y preparar el agua de resuspensión (6 ml de RNAsa/1 ml de agua), agregar entre 100 a 200 µl de TE con RNAsa dependiendo del tamaño del pellet.
7. Observar el ADN en un gel de calidad (servir 2 µl de ADN).

***Buffer de extracción (volumen final de 100 ml)¹:**

Solución	Concentr. Inic.	Concentr. final	Volumen
NaCl	5 M	0.5 M	10 ml.
Tris.	1 M pH 7.5	0.2 M	20 ml.
EDTA	0.5 M pH 8.0	10 Mm	2 ml.
SDS	10 %	1 %	10 ml
Agua bidestilada	1 %		58 ml.

¹ Preparar y agregar el día que se va a realizar la extracción, la proteínasa K. Proteínasa K, 150 µl (10 mg ó 0.01 g/ml de agua).

ANEXO D:

-Preparación del gel de agarosa (1 % para un volumen de 300 ml).

1. Tomar 3 gramos de Agarosa.
2. Agregar la agarosa a 300 ml de TBE 0,5X.
3. Calentar hasta diluir bien.
4. Adicionar 2,5 µl de Bromuro de etidio.
5. Servir en la bandeja de electroforesis y dejar polimerizar.
6. Usar 2000 ml de TBE 0,5X para la cámara de electroforesis.

-Preparación del gel de agarosa (1,5 % para un volumen de 300 ml).

7. Tomar 4,5 gramos de Agarosa.
8. Agregar la agarosa a 300 ml de TBE 0,5X.
9. Calentar hasta diluir bien.
10. Adicionar 2,5 µl de Bromuro de etidio.
11. Servir en la bandeja de electroforesis y dejar polimerizar.
12. Usar 2000 ml de TBE 0,5X para la cámara de electroforesis.

ANEXO E:

- Microsatélites evaluados inicialmente para determinar los más polimórficos en *Phaseolus lunatus*. (Tabla tomada de Gaitán-Solís *et al*, 2002).

Cebador	SSR sequence	Primer sequence	(5'-3')
AG1	(GA)8GGTA(GA)5GGGACG(AG)4	CATGCAGAGGAAGCAGAGTG GAGCGTCGTCGTTTCGAT	Adelantado Retrasado
GATS11	(CT)8CA(CT)2GTTT(CT)4	CACATTGGTGTAGTGTCTGG GAACCTGCAAGCAAGAGC	Adelantado Retrasado
GATS11B	(CT)8	CCCACACATTGGTGTAGTG AGCGCAATGCTACTCGAAAT	Adelantado Retrasado
GATS54	(GA)5AACAGAGT(GA)8	GAACCTGCAAGCAAGAGC TCACTCTCCAACAGATCGAA	Adelantado Retrasado
GAST91	(GA)17	GAGTGCAGGAAGCGAGTAGAG TCCGTGTTCTCTGTCTGTG	Adelantado Retrasado
BM3	(GAA)3GATGAA(GCA)2(GAA)4	CAGAAGTGCTTATCCCCGAG TGAATCTTCCCCTCCTTCA	Adelantado Retrasado
BM6	(GAAA)3	AGGGTTTACACACGACAGGC GGTTGATATGCCCTCATGGT	Adelantado Retrasado
BM16	(CA)21TA(CA)5	CACCGGGAGTGGCTGACA GTTTGGGGCGGAGTTCGA	Adelantado Retrasado
BM20	(CAGA)3GACA(CAGA)12	ATCCGTAGAGAGGTGAACGG ATGAGTGCAGTTGTGTGACG	Adelantado Retrasado
BM25	(CA)17CG(CA)21	CGCCTCCAACGGTCTTCT CAAGCAGGTGCGAATCCA	Adelantado Retrasado
BM48	(GA)5	GCCGTTGAGCTGGAGAGCA CCTTCTTCTTGAGCCCCGCTG	Adelantado Retrasado
BM53	(CT)21(CA)19(TA)9	AACTAACCTCATACGACATGAAA AATGCTTGCACTAGGGAGTT	Adelantado Retrasado
BM67	(CA)31(CG)5(CA)10	CCAATGCTGCCACACAGATA CGCCCTTATGATCCAGTCTT	Adelantado Retrasado
BM68	(CA)6TA(CA)4(TA)4(CA)5	TTCGTTCACAACCTCTTGCATT TGCTTGTATCTTGCCAGTG	Adelantado Retrasado
BM79B	(GA)28	CATGGAGGTAGAGGATAATAAGGAC CATTAGAGCCGCCACTTG	Adelantado Retrasado
BM98	(CA)8(CT)3	GCATCACAAAGGACTGAGAGC CCCAAGCAAGAGTCGATTT	Adelantado Retrasado
BM114	(TA)8(GT)10	AGCCTGGTAAAATGCTCATAG CATGCTTGTTGCCCTAATCTCT	Adelantado Retrasado
BM137	(CT)33	CGCTTACTACTGTACGCACG CCGTATCCGAGCACCGTAAC	Adelantado Retrasado
BM138	(GT)13	TGTCCCTAAGAACGAATATGGAATC GAATCAAGCAACCTTGGATCATAAC	Adelantado Retrasado
BM139	(CT)25	TTAGCAATACCGCCATGAGAG ACTGTAGCTCAAACAGGGCAC	Adelantado Retrasado
BM140	(GA)30	TGCAACAACACATTTAGTGAC CCTACCAAGATTGATTTATGGG	Adelantado Retrasado
BM141	(GA)29	TGAGGAGGAACAATGGTGC CTCACAACCACAACGCACC	Adelantado Retrasado
BM142	(GA)10 ^a (GA)15	TTCCGCTGATTGGATATTAGAG AGCCCGTTCCTTCGTTTAG	Adelantado Retrasado
BM143	(GA)35	GGGAAATGAACAGAGGAAA ATGTTGGGAACTTTTAGTGTG	Adelantado Retrasado
BM146	(CTGTTG)5(CTG)4(TTG)3(CTG)3	GAGATGAGTCTTTCCCTACCC TGCAGACACAATTTATGAAGGC	Adelantado Retrasado
BM147	(CGA)4	GGAACCAACAAGTTCACCTTAG GAGACTGTGCTTTCGGACTC	Adelantado Retrasado

BM148	(CAG)5(CAA)5(CAT(CAA)3CAT(CA A)3	TTGAAACTCTCTTTGCAGACAC AACTAATCCATTGCACTACCC	Adelantado Retrasado
BM149	(TGC)6(TAG)3	CGATGGATGGATGGTTGCAG GGGCCGACAAGTTACATCAAAATTC	Adelantado Retrasado
BM150	(TA)6(TG)19	CGAACTATTTGATACTCATGTGC TTGCAGGACAGATAAGTTAGAAGA	Adelantado Retrasado
BM151	(TC)14	CACAACAAGAAAAGACCTCCT TTATGTATTAGACCACATTACTTCC	Adelantado Retrasado
BM152	(GA)31	AAGAGGAGGTGCAAACCTTAAATCG CCGGGACTTGCCAGAAGAAC	Adelantado Retrasado
BM153	(CA)5(TG)(CA)3CG(CA)10(TA)4	CCGTTAGGGAGTTGTGAGG TGACAAACCATGAATATGCTAAGA	Adelantado Retrasado
BM154	(CT)17	TCTTGCACCGAGCTTCTCC CTGAATCTGAGGAACGATGACCAG	Adelantado Retrasado
BM155	(CA)8	GTTTCATGTTTGTGACAGTTCA CAGAAGTTAGTGTGTTTGAATACA	Adelantado Retrasado
BM156	(CT)32	CTTGTCCACCTCCCATCATAGC TGC TTGCATCTCAGCCAGAATC	Adelantado Retrasado
BM157	(GA)16	ACTTAACAAGGAATAGCCACACA GTTAATTGTTTCCAAATCAACCTG	Adelantado Retrasado
BM158	(CT)22	CCGAGCACCGTAACGTAATGC CGCTCGCTTACTCACTGTACGC	Adelantado Retrasado
BM159	(CT)9(CA)8	GGTGCTGTTGCTGCTGTTAT GGGAGATGTGGTAAGAATAATGAAA	Adelantado Retrasado
BM160	(GA)15(GAA)5	CGTGCCTGGCGAATAGCTTTG CGCGGTTCTGATCGTACTTC	Adelantado Retrasado
BM161	(GA)7(GA)8	TGCAAAGGGTTGAAAGTTGAGAG TTCCAATGCACCAGACATTCC	Adelantado Retrasado
BM164	(GT)9(GA)21	CCACCACAAGGAGAAGCAAC ACCATTCAAGGCCGATACTCC	Adelantado Retrasado
BM165	(TA)3(CA)9	TCAAATCCACACATGATCG TTCTTTTCATTCATATTATCCGTTCA	Adelantado Retrasado
BM166	(CA)3T(CA)7	AAAGTGGGAGAGAAACACTTACCC GATGCTGGCTTTCCATTGAG	Adelantado Retrasado
BM167	(GA)19	TCTCAATACTACATCGTGTGACC CCTGGTGTAAACCCCTGTAACAG	Adelantado Retrasado
BM170	(CT)5CCTT(CT)12	AGCCAGGTGCAAGACCTTAG AGATAGGGAGCTGGTGGTAGC	Adelantado Retrasado
BM171	(GA)13	TGGCATTTCAGATTAACACTCC CTTCTTGCTGTTTCCACTG	Adelantado Retrasado
BM172	(GA)23	CTGTAGCTCAAACAGGGCACT GCAATACC GCCATGAGAGAT	Adelantado Retrasado
BM173	(GT)16(GA)30	ATGCGTAAGCGAGGGAGAG CCAGTATATAACGCTGCTGCTG	Adelantado Retrasado
BM175	(AT)5(GA)19	CAACAGTTAAAGGTCGTCAAAT CCACTCTTAGCATCAACTGGA	Adelantado Retrasado
BM181	(CT)17	ATGCTGCGAGTTAAATGATCG TGAGGAGCAAACAGATGAGG	Adelantado Retrasado
BM183	(TC)14	CTCAAATCTATTCACTGGTCA GC TCTTACAGCCTTGCAAGACATC	Adelantado Retrasado
BM184	(AC)11	AGTGCTCTATCAAGATGTGTG ACATAATCAATGGGTCACTG	Adelantado Retrasado
BM185	(CT)12	AAGGAGGTTTCTACCTAAATTC AAAGCAGGGATGTAGTTGC	Adelantado Retrasado
BM187	(CT)10T(CT)14	TTTCTCAAACACTACTCCTTTCC TGTGTTTGTGTTCCGAAATATGA	Adelantado Retrasado
BM188	(CA)18(TA)7	TGCGCTTGAAACTTCTGTATC CCCTCCAGTTAAATCAGTCG	Adelantado Retrasado
BM189	(CT)13	CTCCCACTCACCCTCACT GCGCCAAGTGAAAC TAATAGA	Adelantado Retrasado
BM195	(GA)23	ACTGTAGCTCAAACAGGGCACT TCCGAGCACCGTAACCTCAAT	Adelantado Retrasado

BM197	(GT)8	TGGACTGGTCGATACGAAGC CCCAGAAGATTGAGAACCAC	Adelantado Retrasado
BM199	(GA)15	AAGGAGAATCAGAGAAGCCAAAAG TGAGGAATGGATGTAGCTCAGG	Adelantado Retrasado
BM200	(AG)	TGGTGGTTGTTATGGGAAG ATTTGTCTCTGTC TATTCTCCAC	Adelantado Retrasado
BM201	(GA)15	TGGTGCTACAGACTTGATGG TGTCACCTCTCTCCTCCAAT	Adelantado Retrasado
BM202	(GA)9GT(GA)4	ATGCGAAAAGAGGAACAATCG CCTTTACCCACACGCCTTC	Adelantado Retrasado
BM205	(GT)11	CTAGACCAGGCAAAGCAAGC TGAGCTGGGATTCA TTTC TG	Adelantado Retrasado
BM209	(TA)4(TG)16	CAACCAATGAATGCTGACAATG CAATTTCTTGATTGAAA GGCAAT	Adelantado Retrasado
BM210	(CT)15	ACCACTGCAATCCTCATCTTTG CCCTCATCTCCATTCTATCG	Adelantado Retrasado
BM211	(CT)16	ATACCCACATGCACAAGTTGG CCACCATGTGCTCATGAAGAT	Adelantado Retrasado
BM212	(CA)13	AGGAAGGGATCCAAAGTCACTC TGAACTTTCAGGTATTGATGAATGAA	Adelantado Retrasado
BM213	(CTT)4(CT)5(CTT)(CT)(CTT)(CT)4	AACCCTAAGCTTCACGCATTTG GAGAGATTGACGACGGTTT	Adelantado Retrasado

ANEXO F:

- Preparacion del gel de poliacrilamida

1. Lavar el vidrio y la cámara con gasa, adicionar detergente alconox, aplicar bastante agua y dejar secar totalmente.
2. Limpiar ambos vidrios con etanol al 96%, utilizando kinwipes (4 veces).
3. Aplicar la mezcla de 1000 µl de etanol al 95% - ácido acético 0,5% + 3 µl de bind silane (Farmacia Biotech, code N° 17-1330-01) a una de las caras del vidrio, esparcir con kinwipes y dejar evaporar por 5 minutos.
4. Aplicar 3-5 gotas de Sigmacote al vidrio de la cámara, esparcir bien con kinwipes y dejar evaporar por 5 minutos.
5. Limpiar los separadores con etanol y colocarlos a cada lado de la cámara.
6. Armar el aparato colocando el vidrio (donde va a quedar el gel) sobre la cámara y poner los brazos, ajustandolos cuidadosamente.
7. Colocar la cámara sobre la base y ajustar las palancas.
8. Mezclar 120 ml de archilamida al 6% con 600 µl de persulfato de amonio al 10% y 100 µl de TEMED, (GibcoBRL, cat 15524-010) y llenar con jeringa, eliminando las burbujas.

9. Conectar la base de la cámara por donde se sirve la acrilamida con la jeringa, cuidando que no se formen burbujas.
10. Colocar el peine con los ganchos hacia fuera, en el borde superior de la cámara y presionarlos con ganchos grandes.
11. Dejar polimerizar la acrilamida por 2 horas.
12. Sacar la cámara de la base y colocarla sobre la cubeta con solución tampón de corrida (TBE 0,5X).
13. Ajustar los accesorios y agregar solución tampón de corrida (TBE 0,5X), a la parte superior de la cámara hasta que cubra el peine; retirar el peine y colocarlos con los dientes hacia dentro para formar los carriles. Presionar con ganchos pequeños.
14. Conectar a la fuente de poder y precorrer con la solución stop a 120 Watts, hasta que el gel alcance una temperatura de 55°C.
15. Sembrar las muestras previamente preparadas (Productos de PCR) y denaturadas, al terminar el corrido de la electroforesis, se desmonta el sistema y se inicia la tinción con plata.

- Tincion con plata.

1. Dejar el gel 20 minutos en solución fijadora (ácido acético glacial + agua bidestilada).
2. Lavar con agua demonizada (3 veces durante 10 minutos).
3. Colocar el gel 30 minutos en solución de Nitrato de Plata (Nitrato de plata + formaldehído al 37% + agua bidestulada).
4. Lavar 10 segundos con agua deionizada.
5. Colocar el gel en solución de revelado (Carbonato de sodio + Formaldehído 37% + Tiosulfato de sodio + Agua bidestilada) hasta que aparezcan las bandas.
6. Dejar el gel 5 minutos en solución de parada (ácido acético glacial + agua bidestilada).
7. Lavar con agua demonizada 3 minutos.
8. Dejar secar el gel a temperatura ambiente.

-Solución tampón de carga para geles de poliacrilamida (Stop Solution).

Reactivo	Concentración
Formamida	95 %
EDTA	20 mM
Azul de Bromofenol	0,05 %
Xilene Cianol FF	0,05 %

ANEXO G:

Resultados obtenidos en la evaluación inicial de 68 marcadores microsatélites para *Phaseolus lunatus* L.

Cebador	Amplificación reportada	Amplificación obtenida en este trabajo	T(°C)
AG1	Polimórfico	Polimórfico	52
GATS11	Negativa	Negativa	52
GATS11B	Negativa	Monomórfico	52
GATS54	Monomórfico	Polimórfico	50
GATS91	Polimórfico	Polimórfico	52
BM3	Monomórfico	Monomórfico	56
BM6	Negativa	Negativa	48
BM16	Negativa	Negativa	54
BM20	Monomórfico	Monomórfico	55
BM25	Negativa	Negativa	55
BM48	Negativa	Negativa	58
BM53	50% Amplificación	Negativa	55
BM67	Negativa	Negativa	50
BM68	50% Amplificación	50% Amplificación	56
BM79B	Polimórfico	Polimórfico	52
BM98	Polimórfico	Polimórfico	55
BM114	Monomórfico	Monomórfico	50
BM137	Negativa	Negativa	55
BM138	Negativa	Negativa	50
BM139	Negativa	Negativa	50
BM140	Polimórfico	Polimórfico	55
BM141	Polimórfico	Polimórfico	60
BM142	Monomórfico	Monomórfico	55
BM143	Polimórfico	Polimórfico	55
BM146	Polimórfico	Polimórfico	58
BM147	Monomórfico	Monomórfico	48

BM148	50% Amplificación	Polimórfico	58
BM149	Polimórfico	Polimórfico	50
BM150	50% Amplificación	Negativa	50
BM151	Polimórfico	Polimórfico	50
BM152	Negativa	Negativa	50
BM153	Monomórfico	Polimórfico	50
BM154	Polimórfico	Polimórfico	50
BM155	Polimórfico	Polimórfico	55
BM156	Polimórfico	Polimórfico	52
BM157	Monomórfico	Polimórfico	52
BM158	Monomórfico	Monomórfico	52
BM159	Negativa	Negativa	52
BM160	Polimórfico	Polimórfico	52
BM161	Polimórfico	Polimórfico	52
BM164	Polimórfico	Polimórfico	52
BM165	Negativa	Negativa	52
BM166	Monomórfico	Monomórfico	52
BM167	Negativa	Monomórfico	50
BM170	Polimórfico	Polimórfico	50
BM171	Polimórfico	Polimórfico	50
BM172	Negativa	Polimórfico	50
BM173	Monomórfico	Monomórfico	50
BM175	Negativa	50% Amplificación	50
BM181	Polimórfico	Polimórfico	50
BM183	Polimórfico	Polimórfico	52
BM184	Negativa	Negativa	52
BM185	Monomórfico	Negativa	52
BM187	Monomórfico	Negativa	52
BM188	50% Amplificación	Negativa	58
BM189	Monomórfico	Negativa	50
BM195	50% Amplificación	50% Amplificación	54
BM197	Polimórfico	Polimórfico	54
BM199	Polimórfico	Polimórfico	56
BM200	Monomórfico	Monomórfico	52
BM201	Polimórfico	Polimórfico	50
BM202	Polimórfico	Polimórfico	58
BM205	Negativa	Negativa	50
BM209	Polimórfico	Polimórfico	56
BM210	Monomórfico	Monomórfico	52
BM211	Polimórfico	Polimórfico	55
BM212	Polimórfico	Polimórfico	53
BM213	Monomórfico	50% Amplificación	52

ANEXO H:

Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de las poblaciones cultivadas de *P. lunatus* del acervo Mesoamericano

IL	PESO	LEC	BM 143	BM 156	BM 148	BM 2 12	BM 153	BM 146	AG 1	BM 183	BM 181	BM 2 02	BM 170	GATS91	BM 140	BM 211	BM 141	BM 201	BM 171	BM 154	BM 155
1559	13,1	M1	150/150	224/224	320/320	200/200	195/195	278/278	153/153	150/150	178/178	152/156	168/168	222/222	160/160	210/210	182/182	90/90	140/140	204/204	140/140
1560	14,1	M1	150/150	218/218	320/320	200/200	195/195	278/278	153/153	150/150	178/178	152/156	168/168	222/222	168/168	210/210	182/182	98/98	140/140	204/204	140/140
1561	12,8	M1	150/150	224/224	320/320	200/200	195/195	278/278	153/153	150/150	178/178	152/156	168/168	222/222	168/168	210/210	182/182	90/90	140/140	204/204	140/140
1562	14	M1	150/150	224/224	320/320	200/200	195/195	278/278	153/153	150/150	178/178	152/156	168/168	222/222	168/168	210/210	182/182	98/98	140/140	204/204	140/144
1563	11,7	M1	150/150	224/224	320/320	200/200	195/195	278/278	153/153	150/150	178/178	152/156	168/168	222/222	168/168	210/210	182/182	98/98	140/140	204/204	140/140
1564	12,4	M1	150/150	224/224	320/320	200/200	195/195	278/278	153/153	150/150	178/178	152/156	168/168	222/222	168/168	210/210	182/182	98/98	140/140	204/204	140/140
1565	11,6	M1	150/150	224/224	320/320	200/200	195/195	278/278	153/153	150/150	178/178	152/156	168/168	222/222	172/172	210/210	182/182	98/98	140/140	204/204	140/140
1567	15	M1	150/150	218/218	320/320	200/200	195/195	278/278	153/153	150/150	178/178	152/156	168/168	222/222	168/168	210/210	182/182	90/90	140/140	204/204	140/140
1568	15,7	M1	150/150	218/218	320/320	200/200	195/195	278/278	153/153	150/150	178/178	152/156	168/168	222/222	172/172	210/210	182/182	98/98	140/140	200/200	140/140
1569	14,7	M1	150/150	218/218	320/320	200/200	195/195	278/278	153/153	150/150	178/178	152/156	168/168	222/222	168/168	210/210	182/182	98/98	140/150	204/204	140/140
1570	13,2	M1	150/150	218/218	320/320	200/200	195/195	278/278	153/153	150/150	178/178	152/156	168/168	222/222	168/168	210/210	182/182	90/90	140/140	204/204	140/140
1571	14,8	M1	150/150	218/218	320/320	200/200	195/195	278/278	153/153	150/150	178/178	152/156	168/168	222/222	168/168	210/210	182/182	98/98	140/140	204/204	140/140
1572	14,7	M1	150/150	218/218	320/320	200/200	195/195	278/278	153/153	150/150	178/178	152/156	168/168	222/222	168/168	210/210	182/182	98/98	140/150	204/204	144/144
1575	14,5	M1	150/150	218/218	320/320	200/200	195/195	278/278	153/153	150/150	178/178	152/156	168/168	222/222	168/168	210/210	182/182	98/98	140/140	204/204	140/140
1576	14,2	M1	150/150	218/218	320/320	200/200	195/195	278/278	153/153	150/150	178/178	152/156	168/168	222/222	174/174	210/210	182/182	98/98	140/140	204/204	144/144
1578	55,4	M1	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	178/178	152/156	168/168	222/222	174/174	200/200	182/182	98/98	140/150	204/204	140/140
1579	51,4	M1	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	178/178	152/156	168/168	216/216	174/174	200/200	182/182	90/90	140/140	204/204	140/140
1580	51,2	M1	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	178/178	152/156	168/168	216/216	174/174	200/200	182/182	90/90	140/140	204/204	140/140
1581	63,2	M1	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	178/178	152/156	168/168	216/216	174/174	200/200	182/182	90/90	140/150	204/204	140/140
1582	53,3	M1	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	178/178	152/156	168/168	216/216	174/174	200/200	182/182	90/90	140/140	204/204	140/140
1586	59,3	M1	144/144	224/224	318/318	200/200	205/205	274/274	153/153	144/144	182/182	148/148	168/168	216/216	164/164	200/200	182/182	90/90	143/143	204/204	140/140
1587	67,3		144/144	218/218	318/318	200/200	205/205	278/278	153/153	144/144	182/182	148/148	168/168	216/217	178/178	200/200	182/182	90/90	143/143	204/204	140/140
1588	61	M1	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	178/178	152/156	168/168	216/216	174/174	200/200	182/182	90/90	140/140	204/204	140/140
1589	64,9	M1	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	178/178	152/156	168/168	216/216	174/174	200/200	182/182	90/90	140/140	204/204	140/140
1590	63,4		144/144	218/218	318/318	200/200	205/205	274/274	153/153	144/144	182/182	148/148	168/168	216/216	178/178	200/200	182/182	90/90	143/143	204/204	140/140
1591	70,6		144/144	218/218	318/318	200/200	195/195	274/274	153/153	144/144	182/182	148/156	168/168	216/216	178/178	200/200	182/182	90/90	143/143	204/204	140/140
1593	62,9		144/144	218/218	318/318	200/200	205/205	274/274	153/153	144/144	182/182	148/148	168/168	216/216	178/178	200/200	182/182	90/90	143/143	204/204	140/140

1595	64,2		144/144	218/218	318/318	200/200	195/195	274/274	153/153	144/144	182/182	148/148	168/168	216/216	178/178	200/200	182/182	90/90	143/143	204/204	140/140
1596	72,2		144/144	218/218	318/318	200/200	195/195	274/274	153/153	144/144	182/182	148/148	168/168	216/216	178/178	200/200	170/182	90/90	143/143	204/204	140/140
1597	66,2	M1	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	182/182	152/156	168/168	216/216	174/174	200/200	182/182	90/90	140/140	204/204	140/140
1599	14,5	M1	150/150	218/218	316/316	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	182/182	152/156	168/172	222/222	168/168	200/200	182/182	98/98	140/140	200/200	140/140
1600	14,4	M1	150/150	218/218	316/316	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	182/182	152/156	168/172	222/222	170/170	200/200	182/182	98/98	150/150	200/200	140/140
1601	13,2	M1	150/150	218/218	316/316	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	182/182	152/156	168/172	222/222	168/168	200/200	182/182	90/90	140/140	200/200	140/140
1602	15	M1	150/150	218/218	316/316	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	182/182	152/156	168/168	222/222	168/168	200/200	182/182	98/98	140/140	200/200	140/144
1603	15,3	M1	150/150	218/218	316/316	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	182/182	152/156	168/168	222/222	168/168	200/200	182/182	98/98	150/150	200/200	140/140
1604	13,2	M2	150/150	218/218	316/316	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	182/182	152/156	172/172	222/222	170/170	200/200	182/182	98/98	150/150	200/200	140/140
1606	17	M2	150/150	218/218	316/316	198/198	205/205	272/272	151/151	150/150	174/182	152/156	168/168	222/222	160/160	200/200	182/182	98/98	150/150	200/200	140/140
1607	14		150/152	218/218	316/316	200/200	195/195	282/282	151/151	150/150	184/184	152/152	166/166	222/223	172/172	180/180	182/182	98/98	150/150	200/200	140/140
1608	14,5	M2	150/150	218/218	316/316	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	182/182	152/156	168/168	222/222	168/168	200/200	182/182	90/90	150/150	200/200	140/140
1609	15,9	M2	150/150	218/218	316/316	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	182/182	152/156	168/168	222/222	168/168	200/200	182/182	90/90	140/140	200/200	140/140
1610	11,3	M2	150/150	218/218	316/316	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	182/182	152/156	168/168	222/222	168/168	200/200	182/182	90/90	144/144	200/200	140/140
1611	12,9	M4	150/150	218/218	316/316	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	182/182	152/152	168/172	222/222	164/164	200/200	182/182	98/98	150/150	200/200	140/140
1612	15,6	M2	150/150	218/218	316/316	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	182/182	152/152	172/180	222/222	164/164	200/200	182/182	98/98	140/150	204/204	140/140
1613	16	M2	150/150	218/218	316/316	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	174/182	152/152	168/168	222/222	168/168	200/200	182/182	98/98	150/150	200/200	140/140
1614	16,3	M2	150/150	218/218	316/316	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	174/174	152/152	168/168	222/222	168/168	200/200	182/182	90/90	150/150	200/200	140/140
1621	17,1	M2	144/144	218/218	318/318	200/200	195/195	274/274	151/151	150/150	178/182	148/148	168/168	222/222	174/174	180/180	182/182	98/98	150/150	200/200	140/140
1619	15,1	M1	144/144	218/218	318/318	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	174/174	152/152	168/168	222/222	172/172	200/200	182/182	98/98	140/140	192/192	140/140
1622	12,7	M1	150/150	218/218	318/318	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	174/174	152/152	168/168	226/226	172/172	200/200	182/182	98/98	140/140	192/192	140/140
1624	15,5	M1	144/144	218/218	318/318	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	174/174	152/152	168/168	226/226	172/172	200/200	182/182	90/90	140/140	192/192	140/140
1626	12,9	M1	150/150	218/218	318/318	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	174/174	152/152	168/168	226/226	172/172	200/200	182/182	98/98	140/140	192/192	140/140
1627	10	M1	144/144	218/218	318/318	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	174/174	152/152	168/168	226/226	172/172	210/210	182/182	90/90	140/140	192/192	140/140
1628	15,8	M1	150/150	218/218	318/318	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	174/174	152/152	168/168	226/226	172/172	210/210	182/182	98/98	140/140	192/192	140/144
1629	14,8	M1	144/144	218/218	318/318	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	174/174	152/152	168/168	226/226	172/172	200/200	182/182	90/90	140/140	192/192	140/140
1630	14,9		144/144	218/218	318/318	200/200	195/195	272/272	151/151	150/150	174/174	152/156	168/168	226/226	174/174	180/180	182/182	98/98	143/143	192/192	140/140
1631	16	M1	144/144	218/218	318/318	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	174/174	152/152	168/168	226/226	172/172	210/210	182/182	90/90	140/140	192/192	140/140
1632	13,6		152/152	218/218	318/318	200/200	195/195	272/272	151/151	150/150	174/174	152/152	168/168	222/222	174/174	180/220	182/182	98/98	143/143	192/192	140/140
1633	11,6		144/144	218/218	318/318	200/200	195/195	272/272	151/151	150/150	174/174	152/152	168/168	222/222	174/174	180/180	182/182	98/98	143/143	192/192	140/140
1635	14,6	M1	150/150	218/218	318/318	200/200	205/205	272/272	151/151	150/150	174/174	152/152	168/168	226/226	172/172	210/210	182/182	90/90	140/140	192/192	140/140

1676	48,9	M2	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	178/178	146/146	168/168	222/222	172/172	200/200	170/170	90/90	140/140	204/204	140/140
1678	46,7	M1	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	178/178	146/146	168/168	222/222	172/172	200/200	174/174	90/90	140/140	200/200	140/140
1679	41,2	M1	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	178/178	146/146	168/168	222/222	172/172	200/200	182/182	90/90	140/140	204/204	140/140
1680	44	M1	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	178/178	146/146	168/168	222/222	172/172	200/200	182/182	90/90	140/140	204/204	140/140
1681	40,9	M1	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	182/182	146/146	168/168	222/222	172/172	200/200	182/182	90/90	140/140	204/204	140/140
1682	45,7		144/144	218/218	318/318	200/200	195/195	274/274	153/153	144/144	182/182	148/148	168/168	222/222	174/174	202/202	182/182	90/90	143/143	204/204	140/140
1683	46,4	M1	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	178/178	146/146	168/168	222/222	172/172	200/200	174/174	90/90	144/144	204/204	140/140
1684	49	M1	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	178/178	146/146	168/168	222/222	172/172	200/200	174/174	90/90	140/140	204/204	140/140
1685	37	M1	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	280/280	153/153	144/144	178/178	146/146	168/168	222/222	172/172	200/200	178/178	90/90	140/140	204/204	140/140
1686	40,6		144/144	218/218	318/318	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	182/182	148/148	158/158	222/222	174/174	202/202	182/182	90/90	143/143	204/204	140/140
1687	45,2	M1	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	178/178	146/146	168/168	222/222	172/172	200/200	178/178	90/90	140/140	204/204	140/140
1691	45,4	M1	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	182/182	148/148	168/168	222/222	174/174	202/202	182/182	90/90	143/143	204/204	140/140
1689	41,6	M1	144/144	218/218	318/318	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	182/182	148/148	168/169	216/216	174/174	202/202	182/182	90/90	143/143	204/204	140/140
1693	49,2	M1	144/144	224/224	316/316	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	178/178	146/146	168/168	222/222	172/172	200/200	174/174	90/90	140/140	204/204	140/140
1694	49,3	M1	144/144	224/224	316/316	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	178/178	146/146	168/168	222/222	172/172	200/200	178/178	90/90	140/140	204/204	140/140
1695	47,4	M1	144/144	218/218	316/316	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	178/178	146/146	168/168	222/222	172/172	200/200	182/182	90/90	140/140	204/204	140/140
1698	28,4	M1	144/144	218/218	316/316	200/200	195/195	272/272	153/153	144/144	182/182	152/156	168/168	216/216	172/172	216/216	182/182	95/95	140/140	192/192	140/140
1699	24,2	M8	144/144	218/218	318/318	200/200	195/195	272/272	153/153	144/144	182/182	152/156	172/180	222/222	172/172	210/210	170/170	90/90	140/140	192/192	140/140
1700	26,1	M8	144/144	218/218	316/316	200/200	195/195	272/272	153/153	144/144	182/182	152/152	160/172	216/216	172/172	210/210	174/174	90/95	140/140	200/200	140/140
1701	29,4		144/144	224/224	316/316	200/200	195/195	274/274	153/153	144/144	182/182	148/148	160/172	216/216	174/174	220/220	182/182	98/98	143/143	192/192	140/140
1702	22,4		150/150	224/224	316/316	200/200	195/195	274/274	153/153	144/144	182/182	148/148	184/184	216/216	174/174	202/202	182/182	98/98	143/143	200/200	140/140
1703	24,8	M8	150/150	218/218	316/316	198/200	195/195	272/272	153/153	144/144	178/182	152/156	168/168	222/222	172/172	200/200	182/182	90/90	140/150	200/200	140/140
1704	35,9	M8	152/152	218/218	318/318	200/200	195/195	272/272	153/153	144/144	182/182	146/152	168/180	216/216	172/172	200/200	182/182	90/90	140/140	192/192	140/140
1705	27,6	M1	152/152	224/224	316/316	200/200	195/195	272/278	153/153	150/150	182/182	146/146	168/172	216/216	164/172	200/200	182/182	98/98	140/140	192/192	140/140
1706	29,2	M1	144/144	224/224	316/316	200/200	195/195	274/274	153/153	150/150	178/182	148/148	184/184	216/216	174/174	220/220	182/182	90/90	143/143	192/192	140/140
1707	23,5	M1	144/144	218/224	318/318	200/200	195/195	278/278	153/153	150/150	182/182	146/146	172/172	222/222	164/164	200/200	174/178	90/90	140/140	200/200	140/140
1708	25,7	M1	144/144	224/224	316/316	198/200	195/195	280/280	153/153	144/144	178/182	148/148	184/184	216/216	168/168	202/202	174/174	98/98	143/143	204/204	140/140
1710	26,3	M1	152/152	224/224	318/318	200/200	195/195	280/280	153/153	144/144	178/182	148/148	184/184	216/216	168/174	202/202	174/174	95/95	143/143	204/204	140/140
1711	23,1	M1	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	272/278	153/153	150/150	182/182	146/152	168/172	222/222	176/176	200/200	170/170	95/95	140/140	192/192	140/140
1712	25,1	M2	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	272/272	153/153	144/144	182/182	146/152	172/172	222/222	164/164	200/210	174/174	95/95	140/140	192/192	140/140
1713	26,7	M8	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	272/272	153/153	144/144	182/182	146/152	168/172	222/222	164/164	216/216	174/174	90/90	140/140	204/204	140/140

1714	26,4	M2	144/144	224/224	318/318	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	182/182	146/152	172/172	222/222	164/164	200/210	170/170	98/98	140/140	192/192	140/140
1715	23,6	M2	144/144	224/224	316/318	200/200	195/195	272/278	145/145	144/144	185/185	146/146	172/172	0/0	168/168	0/0	178/178	90/90	0/0	190/204	140/140
1716	27,2	M1	144/144	218/224	316/318	200/200	195/195	278/278	153/153	144/144	185/185	146/146	172/172	0/0	164/164	0/0	178/178	90/94	0/0	190/204	140/140
1717	23,8	M2	160/160	224/224	318/318	200/200	205/205	272/278	145/145	144/144	185/185	146/146	172/172	0/0	164/178	0/0	178/178	94/94	0/0	190/204	140/140
1718	19	M1	144/152	224/224	316/318	200/200	195/195	280/280	153/153	150/150	178/182	148/148	184/184	216/216	174/174	202/220	174/174	90/90	143/143	204/204	140/140
1719	23,7	M1	152/152	218/218	316/316	200/200	205/205	274/280	153/153	144/150	178/182	148/148	184/184	216/216	174/174	202/202	170/170	98/98	143/143	204/204	140/144
1720	25,4	M1	152/152	218/218	318/318	200/200	205/205	280/280	153/153	144/150	178/182	148/148	176/176	216/216	168/174	202/202	170/170	90/90	143/143	192/204	140/144
1721	22,1	M1	150/150	218/218	316/316	198/198	205/205	274/274	153/153	144/144	178/182	148/148	168/172	222/222	174/174	202/202	174/174	90/90	143/143	200/204	140/140
1722	19,4	M1	144/150	218/224	316/316	200/200	195/195	274/274	157/157	144/144	185/185	148/148	172/172	0/0	172/172	0/0	168/168	90/90	0/0	196/196	140/141