

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA



**Análisis de diversidad genética de comba (*Phaseolus lunatus*) de Tierra
Caliente, Guerrero**

Por:

VALERIA GUADALUPE VIZCARRA MANRÍQUEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre, 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Análisis de diversidad genética de comba (*Phaseolus lunatus*) de Tierra Caliente,
Guerrero

Por: Valeria Guadalupe Vizcarra Manríquez

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Jurado examinador



Dr. Julio César Tafolla Arellano
Asesor Principal Interno



Dr. Raúl Rodríguez Herrera
Asesor Principal Externo



Dr. M. Humberto Reyes Valdés
Coasesor



Dra. Lizeth Campos Múzquiz
Coasesora externa



M.C. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de la División de Ingeniería

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre, 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Análisis de diversidad genética de comba (*Phaseolus lunatus*) de Tierra Caliente, Guerrero.

Por: Valeria Guadalupe Vizcarra Manríquez

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría



Dr. Julio César Tafolla Arellano
Asesor Principal Interno



Dr. Raúl Rodríguez Herrera
Asesor Principal Externo



Dr. M. Humberto Reyes Valdés
Coasesor



Dra. Lizeth Campos Múzquiz
Coasesora externa

Saltillo Coahuila, México.

Noviembre, 2024

III

DERECHO DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.

Atentamente.

Alma Terra Mater

Valeria Vizcarra M.
Valeria Guadalupe Vizcarra Manríquez
Autora Principal

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por formarme no solo como profesionista si no como el ser humano que soy actualmente,

Agradezco al Dr. **Julio César Tafolla Arellano** por abrir las puertas de su laboratorio, permitirme realizar mi servicio social y confiar en mi para llevar a cabo este proyecto, así como por inculcarme el amor y respeto por la ciencia, gracias por todo su apoyo, consejos y conocimientos compartidos como maestro y asesor.

Al **Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular UAAAN** por recibirme y permitirme ser parte de su equipo, así como por todo el conocimiento adquirido, gracias.

Al **Dr. Raúl Rodríguez Herrera** por recibirme en su laboratorio y permitirme terminar este proyecto, gracias por todo el apoyo y conocimiento compartido.

A la **Dra. Lizeth Guadalupe Campos Muzquis** quien me dio todo su apoyo durante la realización de este proyecto, por no dejarme sola durante el proceso y brindarme toda su paciencia, muchas gracias.

Al **Dr. Humberto Reyes Valdez** por su apoyo en la realización de este proyecto y su disposición.

Al **Laboratorio de Biología Molecular y Celular** quien me brindo todo su apoyo y amistad, muchas gracias

Agradezco a mi **familia** por brindarme todo su apoyo y comprensión a la distancia por creer en mí siempre e inspirarme a cumplir todas mis metas, gracias por enseñarme a luchar.

A mis **amigos** quienes se convirtieron en familia y me ayudaron a crecer, fue un privilegio coincidir con ustedes, gracias por todas las lágrimas y risas que compartimos juntos, siempre los llevare en mi corazón.

DEDICATORIA

A mi madre y mejor amiga **Beatriz Elena Manríquez Flores** gracias por darme la vida y enseñarme a luchar siempre, por no soltarme nunca de la mano y permitirme volar, todo lo que soy te lo debo a ti. Este y todos mis logros no serían posibles sin tu amor, apoyo y sacrificio, te amo ma.

A mi padre **Marcos Ulises Vizcarra Monroy** gracias por todo tu amor y sacrificio, por darme siempre palabras de ánimo y apoyo. Mis logros son posibles gracias a ti, te amo.

A mi hermano mayor **Marco Ulises Vizcarra Manríquez** quien ha sido siempre mi ejemplo a seguir de lucha y fortaleza, gracias por desear lo mejor para mí y por guiarme a través de la vida, tu amor, apoyo e inspiración han sido clave para cumplir mis metas.

A mi hermana mayor y compañera de vida **Diana Laura Vizcarra Manríquez** por siempre aventurarse primero y hacer el camino un poco más fácil para mí soy afortunada de haber crecido junto a ti, por tus palabras de apoyo y enseñanzas muchas gracias.

A mis abuelos maternos **María del Carmen Flores y Heriberto Manríquez** por apoyarnos siempre, rezar por nosotros cuidarnos y protegernos, espero poder recompensar todos sus sacrificios, los amo infinitamente.

A **Carolina Barrón** mi cuñada y hermana gracias por el apoyo y el amor que me has dado siempre, pero sobre todo gracias por hacerme tía.

A mis sobrinas **Jennifer y Odette Vizcarra** quienes llegaron a este mundo a enseñarme sobre el amor incondicional, me han dado la mayor alegría de mi vida. Espero ser un ejemplo a seguir y prometo siempre estar para ustedes, las amo.

A **Santiago Alonso Gaytán Sánchez** quien me enseñó a creer en mí misma y cuyo amor ha sido incondicional siempre, gracias por creer en mi capacidad para lograr lo que me proponga, por cuidarme, protegerme, pero sobre todo amarme. Sin ti este proyecto no sería posible, mi vida es mejor a ti, te amo mi Santi.

A **Karla Jurado Badillo** mi mejor amiga y hermana quien me ha enseñado sobre la amistad y el amor, gracias por convertirte en mi familia y mi mayor apoyo, por estar ahí siempre, agradezco a Dios por haber coincidido contigo, te quiero amiga

A **Jairo Fabián Marcos Duran** agradezco tu amistad y lealtad, por siempre estar para mí, apoyarme y hacer de esta etapa una de las mejores de mi vida, te quiero amigo.

A mi gatito **Fibonacci** por alegrar mis días con su dulce presencia y por estar junto a mí en mis noches de desvelo.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	V
DEDICATORIA	VI
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO	VIII
ÍNDICE DE CUADROS	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
RESUMEN	XII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis:	3
1.2 Objetivo General:	3
1.3 Objetivos Específicos:	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Generalidades de la comba	4
2.1.1 Botánica	6
2.1.2 Descripción Morfológica de la planta:	6
2.1.3 Características de la semilla:.....	7
2.1.4 Bromatológico.....	7
2.1.5 Características de la raíz:.....	8
2.1.6 Características de la flor:	8
2.1.7 Características del fruto:.....	9
2.1.8 Germinación	9
2.1.9 Hábitat y distribución:	10
2.2 Usos de la comba:	12
2.2.1 Calidad de la semilla.....	12
2.2.2. Descripción varietal.....	13
2.2.3 Características físicas de la semilla	14
2.2.4 Marcadores moleculares ISSR.....	14
2.2.5 Reacción en cadena de la polimerasa PCR.....	15

III. Materiales y Métodos	16
3.1 Recolección del material vegetal	16
3.2 Extracción de ADN.....	18
3.3 Electroforesis en gel de agarosa	18
3.4 Amplificación por PCR	19
3.5 Análisis genético	20
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
V. CONCLUSIONES.....	28
VI. LITERATURA CITADA	29

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Ubicación de los lugares donde se realizaron las colectas.....	16
Cuadro 2. Concentraciones de la PCR.....	19
Cuadro 3. Temperaturas de alineamiento de los diferentes marcadores moleculares ISSR utilizados.....	19
Cuadro 4. Medidas de diversidad genética de los 7 genotipos	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de <i>Phaseolus lunatus</i>	2
Figura 2. Cultigrupos de frijol lima cultivado	5
Figura 3. Semillas de frijol lima	5
Figura 4. Floración de la comba	9
Figura 5. Distribución geográfica de los acervos	11
Figura 6. Mapa de las localidades donde se recolectaron los genotipos de <i>Phaseolus lunatus</i>	17
Figura 7. Morfología y tamaños de las semillas de los diferentes genotipos de <i>Phaseolus lunatus</i>	17
Figura 8. Kit Dneasy Mericon Food. (QIAGEN Hilden, Germany).	18
Figura 9. Equipo de electroforesis	18
Figura 10. Termociclador MAXYGENE (AXYGEN)	20
Figura 11. Gel de electroforesis con marcador molecular ISSR11	21
Figura 12. Dendograma obtenido a partir de la correlacion cofenetica "Positive Matching"	25
Figura 13. Coordenadas principales (AcoP) "	26
Figura 14. Número de muestras requeridas para estudio de diversidad genética	27

RESUMEN

Phaseolus lunatus comúnmente conocido como frijol lima o comba es la segunda especie con mayor importancia económica del género *Phaseolus* solo después del frijol común, es una especie herbácea anual perteneciente al grupo de las leguminosas, tiene una gran importancia económica en diferentes países. En México es un cultivo de subsistencia para grupos étnicos como los mayas de la península de Yucatán, de igual manera en la región de Tierra Caliente, Guerrero representa un cultivo de importancia cultural y comercial. A pesar de ser un cultivo de gran importancia no se han realizado estudios a nivel molecular, ni de diversidad genética, por lo que el objetivo de la presente investigación fue determinar la diversidad genética de diferentes genotipos de *Phaseolus lunatus* recolectados en Tierra Caliente, Guerrero mediante marcadores moleculares ISSR. Se recolectaron 7 genotipos de diferentes localidades de la región: Blanco (1), Blanco Violento (2), Flojo Ojo Negro(3), Grande Ojo Negro(4), Muy Violento(5), Pinto Violento(6), Rayado(7). Se emplearon 9 marcadores moleculares ISSR, las bandas obtenidas mostraron un 100% de polimorfismo y los resultados determinaron que la muestra mínima requerida son 5 muestras. Se creó una matriz binomial de presencia y ausencia la cual fue analizada en el software de infogen donde se obtuvo que la diversidad era mayor entre los genotipos (81.29%) que dentro de los genotipos (18.71%). Se observaron tres grupos principales entre los genotipos esto debido al grado de parentesco y de distancia genética que hay entre ellos por ejemplo el grupo 1 conformado por los genotipos (2 y 3) se les unían los genotipos 1 y 4 mientras que grupo 2 conformado por los genotipos (5 y 6) se les unía el genotipo 7. La diversidad era mayor entre los genotipos que dentro de los genotipos debido a que *Phaseolus lunatus* es una especie de tipo autógama.

Palabras clave: Diversidad genética, ISSR, Comba, *Phaseolus lunatus*

I. INTRODUCCIÓN

El género *Phaseolus* tiene su origen en el continente americano, este incluye al menos 70 especies de las cuales 50 crecen en México, pero solo cinco han sido domesticadas y cultivadas en todo el mundo, las cuales son: *Phaseolus acutifolius*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus coccineus*, *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus polyanthus* (Martínez, 2014).

Phaseolus lunatus comúnmente conocido por los agricultores como comba, frijol mantequilla, lima, pallar, haba pallar e ib pertenece al género *Phaseolus* y al grupo de los cinco taxa-domesticados del género. Después del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es la segunda especie con mayor consumo y distribución de dicho género. Lo que distingue a *Phaseolus lunatus* es su bajo contenido de grasas, pero como todo frijol se le considera nutritivo por su aportación de proteínas, carbohidratos, hierro, fibra y calcio (López-Alcocer *et al.*, 2016).

P. lunatus tiene una gran importancia económica en países como Perú y Estados Unidos siendo una fuente de comercio, pero en México representa un cultivo de gran relevancia para ciertos grupos étnicos, entre ellos los Mayas de la península de Yucatán, ya que este frijol es un cultivo de subsistencia, así como el cuarto cultivo más importante de la región (Martínez, 2015)

Diversos estudios sugieren que *Phaseolus lunatus* probablemente se originó en la región neotropical de América, extendiéndose desde México y América Central hasta la zona andina de Perú y Chile, así como otras regiones de América del Sur. Se ha sugerido a Guatemala como el posible lugar de origen debido a la presencia de poblaciones silvestres de esta especie en el país. No obstante, otros trabajos, incluyendo estudios con evidencias moleculares, argumentan que el origen podría situarse en la región andina, con una posterior distribución hacia otras áreas de América a través de su domesticación (FAO, 2018). En este sentido, se han identificado dos reservorios genéticos principales de *P. lunatus*: el acervo Andino (A) y el Mesoamericano (M). Dentro del acervo Mesoamericano, se han reconocido dos grupos genéticos: Mesoamérica I (MI), localizado principalmente en el occidente de México, y Mesoamérica II (MII), distribuido desde el sur de México y América Central hasta el norte de Argentina. Un análisis basado en marcadores moleculares de microsatélites realizado en 67 poblaciones silvestres de *P. lunatus* de México propuso dos subgrupos dentro de MI,

denominados MIa y MIB, que presentan una superposición geográfica (Martínez-Castillo *et al.*, 2014). Según López-Alcocer *et al.* (2016), la domesticación de esta especie habría ocurrido en tres centros principales: para el acervo Andino, en los valles de Perú y Ecuador; mientras que para el acervo Mesoamericano se plantean dos áreas: una en el occidente de México, abarcando los estados de Jalisco, Michoacán y Guerrero para el grupo MI, y otra entre Guatemala y Costa Rica para el grupo MII.

Para estimar la diversidad genética entre cultivares comúnmente se utilizan métodos a base de características morfológicas, y bioquímicas o bien con información de pedigrí, pero estas estimaciones tienen ciertas limitaciones sobre todo al usarse en plantas cuya base genética es estrecha (Arnao *et al.*, 2010). Por esta razón, se han empleado marcadores moleculares que resultan más eficientes, además, ofrecen un panorama más amplio y completo de la variabilidad genética, y de su distribución entre poblaciones (Martínez, 2014).

Existen diversos estudios de variabilidad genética en *Phaseolus vulgaris*, sin embargo, es poca la información que se tiene en *Phaseolus lunatus* (Figura 1) que tiene una relevancia económica, al igual que el frijol común y a pesar de que se han realizado tanto estudios de variabilidad morfológica como de caracterización físico-química y análisis de calidad en semilla, aun no se han reportado estudios usando marcadores moleculares basados en ADN.



Figura 1. Planta de *Phaseolus lunatus* sembrada en el laboratorio de biotecnología y biología molecular UAAAN.

1.1 Hipótesis:

Existe mayor diversidad genética entre genotipos, que dentro de los genotipos de *Phaseolus lunatus* recolectados en Tierra Caliente, Guerrero.

1.2 Objetivo General:

Determinar la diversidad genética de diferentes genotipos de *Phaseolus lunatus* recolectados en Tierra Caliente, Guerrero, mediante marcadores moleculares ISSR.

1.3 Objetivos Específicos:

1.3.1 Estimar la diversidad genética entre y dentro de diferentes genotipos de *Phaseolus lunatus* recolectados en Tierra Caliente, Guerrero mediante marcadores moleculares ISSR.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades de la comba

Phaseolus lunatus es conocido como frijol lima, comba, pallar, ib, haba pallar o frijol mantequilla. Es una de las cinco especies domesticadas del género *Phaseolus* y ocupa el segundo lugar en importancia económica después del frijol común. *Phaseolus lunatus* es una especie herbácea anual, pertenece a la familia de las leguminosas y se llega a cultivar en países cuyo clima es cálido y templado. Esta especie suele confundirse con *Phaseolus vulgaris*, pero es posible diferenciarla debido a que posee pedicelos cortos (Martínez, 2021).

Uno de los criterios principales empleados para explicar el origen y la diversidad de *P. lunatus* es el análisis de la variación en las características morfológicas de sus semillas. Se ha comprobado que el morfotipo “big lima”, que tiene semillas relativamente grandes, pertenece al reservorio genético de los Andes, mientras que los morfotipos “potato” tiene semillas pequeñas y “sieva” tiene un tamaño intermedio están asociados al reservorio de Mesoamérica. Esquivel y colaboradores (1990) investigaron el origen y la distribución del frijol lima en Cuba utilizando diferentes características morfológicas de las semillas en 173 poblaciones. Basándose en la variación observada en 11 características diferentes, lograron clasificar estos frijoles en siete grandes grupos: silvestre, maleza, patata, patata-sieva, sieva, sieva-big lima y big lima (Vargas *et al.*, 2003).

Phaseolus lunatus var. *Lunatus* alberga a las poblaciones que han sido domesticadas. Esta variedad botánica está dividida en tres cultigrupos, los cuales están basados en la forma y tamaño de las semillas, por ejemplo; a) Gran lima, cuya principal característica es que su semilla es plana y de gran tamaño, b) Sieva, la cual posee una semilla cuyo tamaño es medio, y con la forma característica de un riñón, por último, c) Papa, la cual se caracteriza porque su semilla es de pequeño tamaño y de forma globular (Figura 2 y 3). A su vez *Phaseolus lunatus* var. *Silvester*, alberga a aquellas poblaciones silvestres. Estas poblaciones se caracterizan por poseer la habilidad de construir bancos de semilla cuando están en el suelo, estos tienen la capacidad de mantenerse viables durante 3 años una vez iniciada su dispersión (Pech, 2020).



Figura 2. Cultigrupos de frijol lima cultivado (*P. lunatus*, var. *Lunatus*) A) gran lima, B) papa y C) sieva. Fuente: Pech, (2020).



Figura 3. Semillas de frijol lima silvestre. Fuente: Pech, (2020).

2.1.1 Botánica

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares)

División: Magnoliophyta (plantas con flor)

Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas)

Subclase: Rosidae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Phaseolus*

Especie: *Phaseolus lunatus*

2.1.2 Descripción Morfológica de la planta:

P. lunatus es una especie plurianual, es decir que dura diversos años en producción y florece más de una vez. La especie se caracteriza por su autogamia, debido a que el polen y el estigma maduran al mismo tiempo y están ubicados muy cerca uno del otro dentro de la flor. No obstante, también se observan tasas de polinización cruzada de hasta 48%, lo que indica que presenta un sistema de apareamiento mixto. Además, tiene un crecimiento indeterminado, con una temporada de floración extendida y una abundante producción de vainas (Gil, 2018).

Esta planta presenta dos patrones de crecimiento: determinado e indeterminado. En el crecimiento determinado, la yema terminal se transforma en una inflorescencia, mientras que, en el crecimiento indeterminado, la yema terminal continúa desarrollándose como una guía o tallo principal. Son hierbas trepadoras y perennes que poseen flores de color lila claro o rosadas, tienen una quilla con forma de espiral y nudos de la inflorescencia no engrosados, flores de más de 1 cm de largo, cáliz no más de 4 mm, hojas con pelos y tiene un fruto plano y curvado (Martínez, 2021).

2.1.3 Características de la semilla:

Phaseolus lunatus llega a tener de 1 a 4 semillas por vaina las cuales son oblongas, cuadradas, reniformes y en algunos casos orbiculares de 6 a 10 mm de largo por 5 a 9 mm de ancho, comprimidas y de color cafés a negras, moteadas con negro e hilo, el cual es una cicatriz que indica el lugar de unión entre la semilla y la placenta, de igual manera cuenta con un oblongo oblanceolado de 1.5 a 2.5 mm de largo, una germinación epigea que al geminar termina desenterrando los cotiledones (*Phaseolus Lunatus - Ficha Informativa*, s. f.). En los genotipos de Tierra Caliente, Guerrero, Nambo-García reportó que la comba blanca (B), blanca violenta (BV), muy violenta (MV), pinta violenta (PV) y floja ojo negro (FON), exhiben predominantemente una forma ovoide. Con un diámetro polar entre 9.10 y 10.76 mm lo que indica que son más grandes a otros genotipos de la especie *Phaseolus lunatus*, del Valle Central de Costa Rica, donde se reportaron valores entre 5.76 y 7.79 mm (Vargas *et al.*, 2003). Por otro lado, en el diámetro ecuatorial, los materiales se caracterizaron por presentar valores desde 13.27 hasta 14.89 mm y en el espesor varió de 4.28 a 4.51 mm. En cuanto a la característica de color de testa de la semilla, en la mayoría de los genotipos de, existió una predominancia de color blanco teniendo el genotipo CB un color 5Y 9/2, mientras que los genotipos CFON, CPV y CBV se caracterizaron por un color blanco amarillento de 2,5Y 8/4 y; el genotipo CMV se identificó con un color blanco amarillento de 2,5Y 8.5/4, según la escala colorimétrica. Finalmente, todos los genotipos mostraron brillantez en su testa.

Una característica distintiva de *P. lunatus* respecto a otras especies son las líneas que se extienden desde el hilo hasta la región dorsal de las semillas. Esta planta tiene cotiledones que pueden ser blancos o verdes, y sus raíces se desarrollan más rápido que las del frijol común, tendiendo además a formar tubérculos (Martínez, 2021).

2.1.4 Bromatológico

En genotipos de Tierra Caliente, Nambo-García (2022), reportó el gran potencial que tiene la semilla de *P. lunatus* como fuente de alimento, que sus 5 genotipos evaluados se caracterizan morfológicamente por tener una forma ovoide, un diferente color de testa, aunque todos presentan una brillantez en esta con un hilio perfecto a excepción de uno, todos los genotipos evaluados de *P. lunatus* varían en la calidad física aunque el genotipo Blanco

sobresalió con el mayor peso de mil semillas con 50.68 g y Flojo Ojo Negro en peso volumétrico con 74,32Kg/Hl.

2.1.5 Características de la raíz:

P. lunatus tiene una raíz primaria a veces tuberosa, frecuentemente lignificada, raramente fibrosa, la cual puede llegar a medir hasta 1.5 metros de longitud (Nambo, 2022). Estas plantas establecen nódulos simbióticos con bacterias que fijan nitrógeno atmosférico, el cual puede ser aprovechado por la planta. Principalmente son colonizadas por rizobios que se encuentran de manera natural en el suelo, aunque tienden a mostrar una preferencia por las bacterias del género *Bradyrhizobium* (FAO, 2018).

2.1.6 Características de la flor:

La planta se distingue por tener una inflorescencia que varía en longitud de 8 a 36 cm. El raquis, que es la parte central del eje de la inflorescencia, puede presentar nudos con más de dos flores cada uno. Los pedicelos que son los soportes de las flores en la inflorescencia, alcanzan hasta 13 mm de largo. Hojas modificadas en la inflorescencia, son oblongo-ovadas y tienen entre 1 y 2 mm de largo, con 3 nervios. Las bractéolas, que son las brácteas secundarias también son oblongo-ovadas y ocasionalmente lanceoladas, midiendo de 1 a 2 mm de largo y generalmente poseen 3 nervios. (*Phaseolus lunatus* - Ficha Informativa, s. f.)

La longitud de sus flores es de 1 a 1.5 cm de largo pueden ser de color lila, rosadas o violetas y blancas (solo en las partes cultivadas), de igual manera cuentan con un cáliz campanulado, cuya longitud es de 2.5 a 3.5 mm de largo, sin tricomas o con pocos pelos largos, dientes laterales y cera de 1mm de largo, estandarte oblongo u orbicular de longitud 6.5 a 7 mm de largo (*Phaseolus lunatus* - Ficha Informativa, s. f.) La planta posee un grupo de pétalos inferiores o frontales en la corola que muestran entre 1,5 a 2 espiras. Cuenta con un estambre vexilar que sobresale cubriendo al resto de los estambres, además de un apéndice globoso en la base. El estigma se vuelve introrso, es decir orientado hacia el interior únicamente cuando la fisura de la antera que libera el polen se abre hacia el interior de la flor (*Phaseolus lunatus*- Ficha Informativa, s. f.)



Figura 4. Floración de la comba, (*Phaseolus lunatus* – *Ficha Informativa*, s. f)

2.1.7 Características del fruto:

P. lunatus produce frutos que son oblongos, dado que son más largos que anchos y tienen una forma falcada similar a una hoz. Estos frutos son péndulos, es decir están sujetos por su parte apical y miden entre 3.5 a 6.5 cm de largo, alcanzando hasta 8.3 cm, y con un ancho de 1 a 1.4 cm. Son comprimidos dehiscentes, lo que significa que se abren al madurar. Las valvas o segmentos del fruto una vez abierto, varían de delgadas a subcoriáceas, casi con una textura como de cuero y son glabras o ligeramente pubescentes (*Phaseolus lunatus* - *Ficha Informativa*, s. f.)

2.1.8 Germinación

La fenología de *P. lunatus* es bastante parecida a la del frijol común, dado que ambas son especies del mismo género. Se identifican diez fases fisiológicas en su desarrollo: germinación, emergencia, hojas primarias, primera hoja trifoliada, tercera hoja trifoliada, botón floral, floración, formación de vainas, llenado de vainas y maduración. La duración de cada etapa varía considerablemente y depende principalmente de la variedad de la planta, su hábito de crecimiento y la duración de su ciclo productivo. (FAO, 2018).

La germinación del frijol lima es de tipo epigea, lo que significa que los cotiledones emergen por encima de la superficie del suelo. Esto ocurre gracias a un crecimiento considerable del hipocótilo, que es la sección del tallo situada entre la radícula y el punto donde se insertan los cotiledones (Gil, 2018).

2.1.9 Hábitat y distribución:

El frijol lima se halla disperso a lo largo del Continente Americano, desde México hasta el norte de Argentina. Este se adapta a una diversidad de ambientes, que incluyen desde zonas costeras bajas en el Pacífico Mexicano y Guatemalteco, donde se sitúan a menos de 800 metros sobre el nivel del mar (msnm) con temperaturas superiores a 22°C, hasta áreas de bosque templado en los valles interandinos que se encuentran a latitudes de 800 a 2000 msnm y con temperaturas que oscilan entre 17 ° y 22 °C. Por lo general, temperaturas inferiores a 14°C, tienden a limitar la distribución de las poblaciones silvestres. (Serrano, 2011).

La planta de frijol lima se adapta exitosamente a una diversidad de condiciones climáticas y ambientales. Prospera en áreas con precipitaciones anuales de entre 900 y 1500 mm. Es considerada una especie con alta tolerancia a la sequía, gracias a su sistema radicular robusto, profundo y bien desarrollado. Además, este cultivo necesita una alta intensidad de luz para producir granos de buena calidad, ya que niveles bajos de luminosidad pueden aumentar la producción de glucósidos cianógenos como la linamarina que son potencialmente tóxicas (FAO, 2018).

Un acervo genético se refiere al conjunto de información genética presente en una población específica de una especie. Este puede clasificarse en tres categorías: primaria, secundaria y terciaria. La primaria incluye las formas silvestres y locales de una especie caracterizadas por cruzamiento comunes y progenies que presentan diferentes grados de esterilidad o fertilidad inter especies. Por último, la terciaria comprende aquellos híbridos resultantes que son estériles y muestran características anormales (Martínez, 2021).

En *Phaseolus lunatus* también conocido como frijol lima se han identificado dos principales acervos genéticos: el mesoamericano y el andino. Estos acervos se diferencian entre sí, principalmente por las características de sus semillas, las propiedades bioquímicas de las proteínas de las semillas y los polimorfismos del ADN nuclear y del cloroplasto. Estas distinciones ayudan a los investigadores a entender la diversidad genética y la adaptación de la especie a diferentes entornos geográficos y climáticos (Pech, 2020).

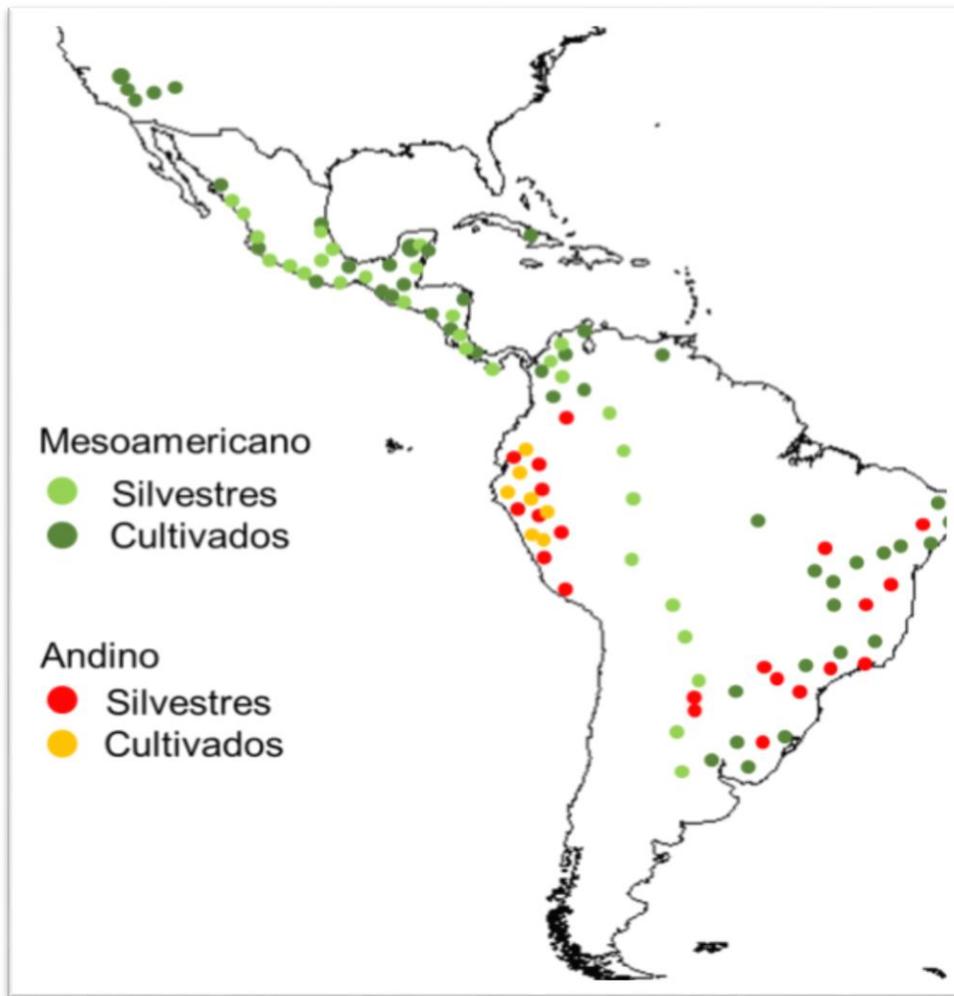


Figura 5. Distribución geográfica de los acervos Mesoamericano y Andino del frijol lima.

Fuente: Gil, 2018.

Dentro del acervo genético mesoamericano de *Phaseolus lunatus*, la estructura genética es más compleja y se divide en dos subgrupos geográfica y genéticamente distintos. Estos grupos son el mesoamericano I (MI) que se localiza en el oeste y noroeste del istmo de Tehuantepec en México, y el mesoamericano II (MII) que se encuentra en la zona este y sureste del mismo Istmo, extendiéndose a través de Centroamérica (incluyendo Guatemala, El Salvador, Honduras y Costa Rica) el caribe (Cuba), y partes de Sudamérica (Colombia, Sur de Perú y Argentina). Por otro lado, el acervo Andino está principalmente restringido a la zona andina del norte de Perú, Ecuador y posiblemente el sur de Colombia. Este acervo se

adapta a vivir en los bosques deciduos, secos y espinosos de la pendiente occidental de la cordillera, donde puede tolerar temperaturas tan bajas como 15°C. Estas diferencias subrayan la adaptación de *Phaseolus lunatus* a una amplia gama de condiciones ambientales y geográficas. Lo que refleja la diversidad y la complejidad de su genética (Serrano, 2011).

2.2 Usos de la comba:

Phaseolus lunatus es fundamentalmente valorado por su uso alimenticio, siendo el segundo tipo de frijol más importante en términos comerciales a nivel mundial, solo superado por el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). En países como Estados Unidos y Perú, el frijol lima tiene una significativa importancia comercial. Sin embargo, en México, este cultivo ha sido tradicionalmente subestimado considerándose más bien un cultivo de subsistencia, particularmente entre cientos grupos étnicos (Martínez, 2021).

El frijol es una excelente fuente de nutrientes, ofreciendo entre un 14% y un 33% de proteínas, además de ser rico en almidón, vitaminas del complejo B y minerales esenciales como calcio, cobre, potasio, magnesio, fosforo y zinc. También aporta una considerable cantidad de fibra alimentaria, con aproximadamente 15.5 a 21.0 gramos por cada 100 gramos de grano cocido. Aunque es deficiente en aminoácidos azufrados y triptófano, el frijol es una buena fuente de lisina proporcionando entre 1.2 a 1.5 gramos por cada 100 gramos de grano. Las semillas de frijol se pueden consumir de diversas formas, ya sea inmaduras, maduras, frescas o secas, adaptándose así a una amplia variedad de dietas y preferencias culinarias (Morales *et al.*,2017).

2.2.1 Calidad de la semilla

La conservación de los recursos fitogenéticos es crucial para garantizar una producción agrícola sostenible. La utilización eficaz de estos recursos ayuda a proteger la seguridad alimentaria y nutricional de la población. Lamentablemente en la actualidad, se ha visto una reducción en la diversidad genética de las semillas. Muchas variedades han desaparecido completamente y otras están en riesgo de seguir el mismo camino. Al mismo tiempo, la base genética de los cultivos principales se ha vuelto cada vez más uniforme. Este empobrecimiento genético representa una amenaza para la seguridad alimentaria global, ya que reduce la capacidad de los agricultores para adaptarse a condiciones cambiantes y para enfrentar desafíos, como el cambio climático y las enfermedades de las plantas. Por lo tanto,

es crucial implementar medidas efectivas de conservación y utilizar de manera sostenible los recursos filogenéticos para proteger la capacidad de producir alimentos en el futuro (Pintor *et al.*, 2020).

Los bancos de semillas representan una importante alternativa para abordar la problemática de la pérdida de diversidad genética en la agricultura. Su función principal es asegurar la diversidad local, promover y conservar variedades de semillas, y contribuir a la sostenibilidad ambiental al preservar la biodiversidad nativa. Además, promueven el derecho a la seguridad, soberanía y autonomía alimentaria en las comunidades campesinas al mejorar el acceso a semillas sin restricciones. El éxito de la conservación de semillas depende en gran medida de la calidad de las variedades conservadas. Por lo tanto, es crucial aplicar conocimientos y pruebas de calidad adecuadas en los recursos genéticos. Estas medidas garantizan que las semillas conservadas mantengan su viabilidad y óptimo rendimiento en los cultivos, asegurando su disponibilidad para las generaciones presentes y futuras. Mediante la conservación y el uso efectivo de bancos de semillas, se puede proteger y promover la diversidad genética de plantas contribuyendo, así a la seguridad alimentaria y la sostenibilidad agrícola a largo plazo (Pintor *et al.*, 2020).

2.2.2. Descripción varietal

El género *Phaseolus* es de suma importancia en México, ya que, de las 150 especies existentes a nivel mundial, 50 se encuentran en este país. Estas especies son vitales como alimentos básicos. Presentan una amplia diversidad en cuanto a tipos de plantas, tamaños de semillas, colores y requisitos ecológicos. Por lo tanto, el conocimiento detallado y la descripción precisa de sus características genéticas, y fenotípicas son fundamentales para proteger estos valiosos recursos genéticos. En este sentido, contar con herramientas que faciliten la caracterización y descripción varietal de las variedades mejoradas es de vital importancia. Estas herramientas permiten identificar y documentar las características únicas de cada variedad, lo que ayuda a preservar y gestionar de manera efectiva la diversidad genética del género *Phaseolus* en México (Ramírez *et al.*, 2019).

2.2.3 Características físicas de la semilla

Un análisis detallado de las semillas proporciona información precisa sobre su estado y calidad. La calidad de una semilla se refiere al valor general que posee, el cual resulta de sus características genéticas y de una serie de factores que influyen en su desarrollo, maduración y capacidad de almacenamiento. Uno de los métodos utilizados para evaluar la calidad de las semillas es el análisis de pureza física. Este análisis tiene como objetivo principal determinar si las semillas contienen impurezas como semillas de otros cultivos o malezas, material inerte, así como verificar la integridad de las propias semillas, como su estado (entero o quebradas) y su tamaño y peso. Este proceso es fundamental para garantizar la calidad y la pureza de las semillas utilizadas en la producción agrícola (De Inspección y Certificación de Semillas, s. f.)

Así es, el análisis de la pureza física es un elemento fundamental para evaluar la calidad de las semillas, y se complementa con otros parámetros clave como la germinación, la viabilidad, el vigor y el contenido de humedad. Estos aspectos en conjunto brindan una visión integral de la calidad y el potencial de las semillas para el cultivo. La germinación indica la capacidad de las semillas para desarrollar plántulas bajo condiciones óptimas, mientras que la viabilidad se refiere a su capacidad para permanecer vivas durante el almacenamiento. El vigor se relaciona con la fuerza y rapidez de la germinación, y el contenido de humedad influye en la longevidad y la conservación de las semillas. Por lo tanto, la combinación de estos parámetros ofrece una evaluación completa y precisa de la calidad de las semillas, lo que es fundamental para una agricultura exitosa (De Inspección y Certificación de Semillas, s. f.)

El examen de la pureza física es un factor determinante para establecer la calidad de las semillas y se considera junto con otros aspectos como la capacidad de germinación, la viabilidad, el vigor y el nivel de humedad. Estos factores combinados proporcionan una evaluación completa de la calidad de las semillas y su idoneidad para su uso en la agricultura (De Inspección y Certificación de Semillas, s. f.)

2.2.4 Marcadores moleculares ISSR

Los micro satélites de tipo ISSR por sus siglas en inglés, (Inter-Simple-Sequence-Repeat) son una variación de la técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA o ADN

polimórfico amplificado al azar). Esta técnica es generalmente más precisa que la RAPD debido a las altas temperaturas de alineamiento que se emplean. La amplificación ISSR permite diferenciar rápidamente entre individuos que están estrechamente relacionados. Este método implica la amplificación del ADN mediante PCR, utilizando un único iniciador que contiene una secuencia de micro satélite anclada en el extremo 3' o 5' por 2 a 4 nucleótidos, los cuales suelen ser arbitrarios y a menudo degenerados. La técnica ISSR puede detectar un mayor número de fragmentos por iniciador en comparación con los RAPD. Los marcadores ISSR tienen la ventaja de producir un gran número de bandas, lo que permite diferenciar de manera más precisa las accesiones que están estrechamente relacionadas. Además, son más económicos en comparación con las técnicas RFLP o RAPD (Morales, 2016)

2.2.5 Reacción en cadena de la polimerasa PCR

Esta técnica ha llegado a ser la principal herramienta diagnóstica de la biología molecular debido a su fácil adaptabilidad y aplicabilidad. El nacimiento de la PCR data de 1971 cuando un artículo publicado en el Journal of Molecular Biology habló sobre un proceso donde se utilizaban enzimas para replicar una secuencia pequeña de ADN de manera *in vitro*. Pero fue hasta 12 años después que este descubrimiento fue atribuido a Kary Mullis quien pertenecía a la *Cetus Corporation* California SA. El gran descubrimiento de la PCR ha sido una gran alternativa para poder estudiar los genes hasta el presente donde se utiliza desde detección de agentes etiológicos hasta genotipificación, así como para análisis de enfermedades genéticas y oncológicas, análisis de especímenes ambientales y de marcadores genéticos para aplicaciones forenses, pruebas de paternidad, mapeo de rasgos hereditarios entre muchos más (Bolívar *et al.*, 2014).

La PCR es una técnica en biología molecular que permite obtener grandes cantidades de un fragmento específico de material genético (ADN o ARN) a partir de cantidades muy pequeñas. La idea principal de esta técnica es que, al replicar muchas veces un fragmento de ADN, es posible identificar con alta precisión, exactitud y eficiencia a los virus, bacterias o parásitos que causan una enfermedad. Esta técnica es ventajosa porque requiere una cantidad mínima de muestra y no necesita que el microorganismo esté vivo en la muestra, solo su material genético (Sánchez Álvarez *et al.*, 2020).

III. Materiales y Métodos

3.1 Recolección del material vegetal

Se recolectó material vegetal en forma de semilla en la región de Tierra Caliente, Guerrero, y llevadas al Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular UAAAN. Las semillas fueron puestas a germinar en macetas en un promedio de 15 días para poder obtener hojas, las cuales fueron utilizadas posteriormente en la extracción de ADN.

Cuadro 1. Ubicación de los lugares donde se realizaron las colectas de *Phaseolus lunatus* en Tierra Caliente, Guerrero.

Genotipo	Municipio	Localidad	Altitud
1	Tlalchapa	Colonia Cuauhtémoc	400 msnm
2	San Miguel	Valle Luz	299 msnm
3	Tlalchapa	Colonia Cuauhtémoc	400 msnm
4	San Miguel Totolapan	Valle Luz	299 msnm
5	San Miguel Totolapan	Valle Luz	299 msnm
6	San Miguel Totolapan	Valle Luz	299msnm
7	San Miguel Totolapan	Valle Luz	299 msnm



Fig 6. Mapa de las localidades donde se recolectaron los genotipos de *Phaseolus lunatus* en Tierra Caliente, Guerrero.

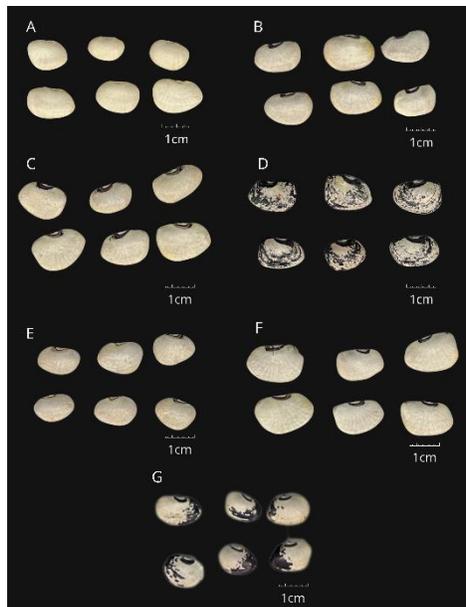


Fig 7. Morfología y tamaños de las semillas de los diferentes genotipos de *Phaseolus lunatus*. A) Blanca, B) Grande Ojo Negro, C) Muy Violento, D) Rayado, E) Blanco Violento, F) Flojo Ojo Negro, G) Pinto Violento.

3.2 Extracción de ADN

Se utilizaron las muestras vegetales previamente germinadas de *Phaseolus lunatus*, cada réplica consistió de 6 plantas por genotipo para extraer ADN de manera individual siguiendo el protocolo de *kit DNeasy Mericon Food* de (QIAGEN Hilden, Germany).



Figura 8. Kit Dneasy Mericon Food (QIAGEN Hilden, Germany).

3.3 Electroforesis en gel de agarosa

Para confirmar la presencia o ausencia del material genético, así como la calidad de este se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE, el cual fue teñido con bromuro de etidio durante 30 minutos. Se retiró el gel y se visualizó en un transiluminador mediante el programa Launch visión pro y se revisó la integridad de las bandas. Posteriormente, la concentración del ADN se cuantificó en un espectrofotómetro de micro placas EPOCH™ (BIOTEK).



Figura 9. Equipo de electroforesis

3.4 Amplificación por PCR

Los fragmentos de ADN se amplificaron mediante PCR con una fórmula de 12 µl (cuadro 2). Se utilizaron 9 primers ISSR con diferentes temperaturas de alineamiento (cuadro 3). Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 1 ciclo a 94 °C durante 1 minuto, 40 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 48 °C 45 segundos y 72 °C por 2 minutos. Finalmente, un ciclo de 72°C durante 3 minutos.

Cuadro 2. Concentraciones de la PCR.

Reactivo	Cantidad
H ₂ O	6.21 µl
<i>Taq</i> polimerasa	0.1 µl
Buffer (10x)	1.25 µl
Cloruro de magnesio	0.5 µl
Dntps mix	0.31 µl
Primer	3.1 µl
ADN genómico	1 µl

Cuadro 3. Temperaturas de alineamiento de los diferentes marcadores moleculares ISSR utilizados

Primer	Secuencia	Temperatura de alineamiento
ISSR1	GAGAGAGAGAGAGATC	48.1
ISSR2	AGAGAGAGAGAGAGATC	43.9
ISSR3	CTCTCTCTCTCTCTAG	46.1
ISSR4	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	56.3
ISSR5	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50.2
ISSR7	AGCAGCAGCAGCAGCAGCGA	51.9
ISSR9	GTGTGTGTGTGTGTGTGTTA	55.9
ISSR11	TCTCTCTCTCTCTCTCC	44.1
ISSR12	GCGAGAGAGAGAGAGAGAGA	50.9

La amplificación se realizó en un termociclador marca MACYGENE I (AXYGEN, Scientific®) para posteriormente preparar una electroforesis con gel de agarosa al 2% y así para visualizar las bandas en un transiluminador obteniendo imágenes con el programa Launch visión UVP.

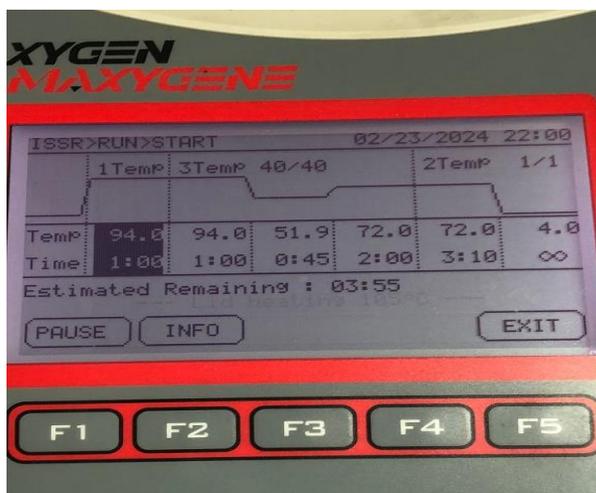


Figura 10. Termociclador MAXYGENE (AXYGEN) en el Laboratorio de Biología Molecular y Celular de la UAdeC.

3.5 Análisis genético

Debido a que se utilizaron marcadores moleculares ISSR, los cuales son de tipo dominante, los fragmentos amplificados se codificaron con una matriz binomial donde 1 indicaba presencia y 0 ausencia de bandas (Balzarini *et al.*, 2010). Usando esta matriz binomial se obtuvo el total de bandas, el % de bandas polimórficas, el número de bandas monomórficas y las bandas que fueron duplicadas. Además, se calcularon parámetros estadísticos como; índice de diversidad genética, la heterocigosis promedio, la heterocigosis insesgada de Nei, el número promedio de alelos observados y el número de alelos efectivos y los loci polimórficos. Se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), y se construyeron dendogramas con base a la similitud y otros análisis como el de coordenadas principales y el de número de muestras mediante el software Info-gen versión 2006 (Balzarini y Di Rienzo, 2004).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el uso de 9 marcadores ISSR se obtuvieron un total de 275 bandas (Figura 9), donde cada una representaba un locus diferente. El 100% de las bandas fueron polimórficas, lo cual es un resultado positivo que permite determinar la diversidad genética en los genotipos que se evaluaron.

Estos resultados son diferentes en comparación con los obtenidos por otros autores como Lorigados *et al.*, (2005) en frijol común, esto puede ser causado por el tipo de iniciador que se utilice, su nivel de polimorfismo y el grado de diversidad genética que haya entre los genotipos. El nivel de polimorfismo entre los genotipos estuvo en el rango de 0.6% a 0.52% donde el genotipo 3 fue el que mostró mayor porcentaje de bandas polimórficas y el genotipo 1 el de menor porcentaje. Se pueden comparar estos resultados con los reportados por Martínez-Reyes (2014), quien obtuvo solo 66 bandas polimórficas en 32 variedades cultivadas y 3 silvestres de *P. vulgaris*, además obtuvo un porcentaje de loci polimórficos de 1, en comparación con la presente investigación, solo utilizó 2 marcadores ISSR a lo que puede deberse la cantidad de bandas obtenidas.

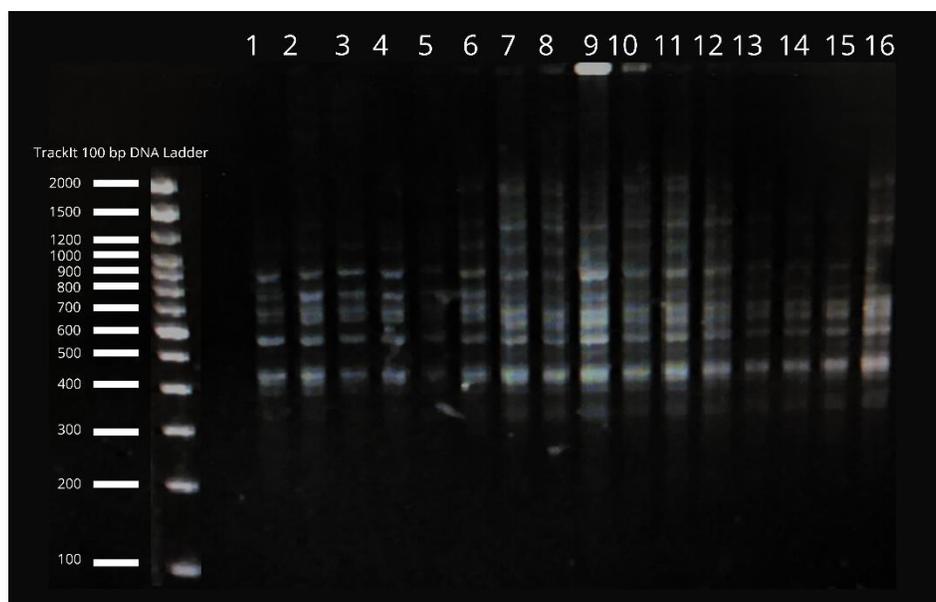


Figura 11. Gel de electroforesis con marcador molecular ISSR11. Carril 1-6; genotipo1, carril 7-12; genotipo 2, carril 13-16; genotipo3.

Una de las medidas que se calcularon fue el índice de diversidad genética insesgado de Nei donde el valor para los 7 genotipos fue de 0.35 (Cuadro 3), siendo el genotipo 3 el que mostró el índice de diversidad más alto, mientras que los genotipos 1, 4 y 5 mostraron el mismo valor bajo de diversidad genética (0.03). La diversidad insesgada de Nei es una medida para calcular diversidad entre poblaciones, mientras más cerca este de 1, más diversos son entre ellos, por lo tanto al obtener 0.35 se puede notar que no existe tanta diversidad entre ellos, al ser individuos de la misma especie siempre tendrán un grado de parentesco, pero al ser recolectados en diferentes localidades el ambiente pudo influir en ellos de distintas maneras. Esta información es relevante para contrastar nuestra hipótesis sobre si existe diversidad o no entre estos genotipos.

Otra medida de variación genética que puede hacerse es la proporción de individuos heterocigotos que hay dentro de una misma población, la cual en este caso se calculó como un promedio de todos los loci, en el caso de los 7 genotipos el valor fue 0 o sea que la probabilidad de que un individuo sea heterocigoto para un loci dentro de la población es nula. El último análisis de diversidad que se realizó fue el índice de heterocigosidad insesgada de Nei, el cual tuvo un valor general para los 7 genotipos de 0.36, siendo nuevamente el genotipo 3 el que presentó un valor más alto, mientras que los genotipos 1 y 4 los que presentaron el valor más bajo, la heterocigosidad insesgada de Nei alcanza su valor más alto cuando sus alelos presentan frecuencias iguales, por lo tanto, en este caso había alelos con frecuencias más altas que otras por eso se obtuvo ese valor, esto se esperaba debido a que *Phaseolus lunatus* es una planta que se reproduce por autofecundaciones tiene intercambio genético limitado así que no presenta gran variabilidad genética.

Cuadro 4. Medidas de diversidad genética de los 7 genotipos de *Phaseolus lunatus* provenientes de Tierra Caliente, Guerrero.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	Total
Loci polimórficos (95%)	0.06	0.22	0.52	0.08	0.10	0.33	0.19	0.98
Diversidad genética	0.03	0.09	0.22	0.03	0.03	0.13	0.06	0.35
Heterocigosis promedio	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Heterocigosis insesgada de Nei	0.03	0.09	0.24	0.03	0.04	0.14	0.07	0.36
Número promedio de alelos	1.06	1.22	1.52	1.08	1.10	1.33	1.19	2.00
Número efectivo de alelos	1.05	1.15	1.39	1.05	1.05	1.23	1.10	1.59
Número de alelos	291	336	419	297	302	367	326	550

G= genotipos

Se obtuvo la medida del número de alelos efectivos por locus para cada genotipo, la cual fue de 1.6 a 1.52, el genotipo 3 mostró el valor más alto y el genotipo 1 el valor más bajo. Mientras que los valores de los alelos efectivos fueron 1.05 para el genotipo 1, 4 y 5, 1.15 para el genotipo 2 y 1.39 para el genotipo 3, 1.23 para el genotipo 6 y finalmente 1.10 para el genotipo 7 obteniendo un total de 1.59. Los alelos efectivos son una medida del número de alelos en una población que son igualmente frecuentes y que contribuyen a la diversidad genética, por lo tanto, al tener valores bajos de alelos efectivos, se tiene poca diversidad y heterocigosis como se describe anteriormente esto ocurre en genotipos como el 1, 4 y 5. De igual manera se calculó el total de número de alelos generados por el locus donde el genotipo 3, fue el que obtuvo más alelos con 419 y el genotipo que obtuvo menos fue el genotipo 1 con 291.

Otro análisis realizado fue el de varianza molecular (AMOVA) para poder medir si la diversidad genética era mayor dentro de los genotipos o entre los genotipos, los resultados mostraron que fue mayor la diversidad entre los genotipos, debido a que el porcentaje fue de 81.29, mientras que el porcentaje de diversidad dentro de los genotipos fue de 18.71. Esto puede deberse a que los genotipos fueron recolectados en diferentes localidades, donde el factor ambiente puede intervenir en su desarrollo creando variabilidad entre individuos de la

misma especie, mientras que en individuos de una misma población cuya reproducción es por medio de autofecundaciones, poco a poco se va eliminando el factor ambiente hasta tener una población homogénea. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Vidal-Barahona *et al.*, (2006) en frijol negro donde se demostró que existía una baja variabilidad genética dentro de su grupo de genotipos mientras que a nivel intraespecífico el grado de parentesco entre genotipos es alto. Por su parte, Moscoso *et al.*, (2020) mencionan que la diversidad dentro de cada cultivar de frijol común que se evaluaron fue escasa debido a su naturaleza de autopolinización, estas variedades son completamente homogéneas pues no presentan diversidad dentro de ellas mismas lo que indica un alto grado de homocigosis lo cual sucede comúnmente en plantas autóгамas.

Para conocer más a fondo la estructura de esta población se midieron los valores de ST y G y así encontrar si había diferenciaciones genéticas dentro de la población o si se creaban agrupamientos de individuos. Se obtuvo un valor de ST de 0.81, cercano a 1, lo que indica una alta diferenciación genética, sugiriendo que las poblaciones son genéticamente distintas. Esto puede deberse a las colectas en distintas localidades de los genotipos. La otra medida que se realizó fue la de G, la cual es una medida de diferenciación genética entre grupos de una misma población, se obtuvo un valor cercano a 1 mostrando que existe una alta diferenciación genética entre los grupos de poblaciones.

Se realizó un dendrograma con la correlación cofenética más alta que fue la de Positive Matching con un valor de 0.996, esto representa mejor las relaciones de similitud entre los genotipos. Se pudo observar como a partir de la regla del 70%, se forman 2 grupos principales: grupo 1 (Genotipo 2 y 3) y grupo 2 (Genotipos 5 y 6). El genotipo 1 se une al grupo 1, así como el genotipo 4 se une a este grupo, los genotipos 5 y 6 son los genotipos donde existe una mayor relación con 0.93 aproximadamente a este grupo se les une el genotipo 7, esta agrupación puede deberse a que algunos genotipos fueron recolectados en la misma localidad, como es el caso del grupo 2, donde ambos fueron recolectados en la región de San Miguel, Totolapan en el estado de Guerrero. Estos resultados son similares a los obtenidos por Lorigados *et al.*, 2005, donde a partir de un índice de truncadura (70.0) se formaron dos grupos principales entre sus genotipos estudiados.

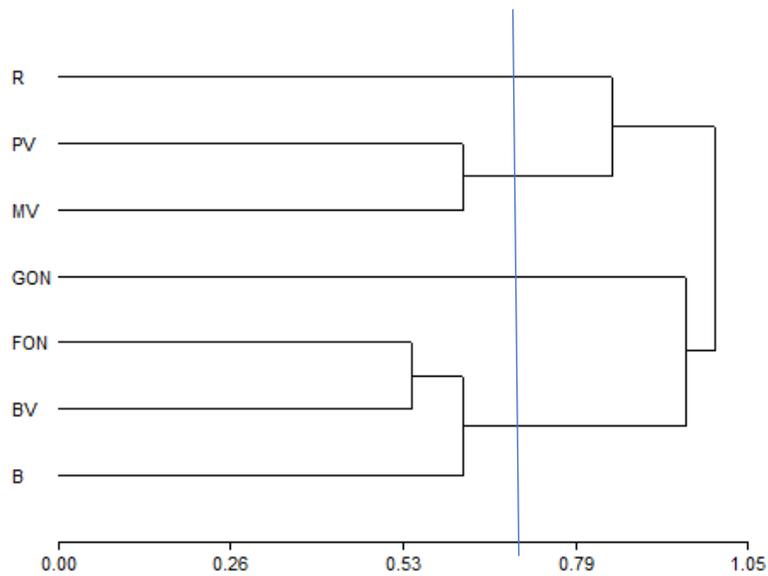


Figura 12. Dendrograma obtenido a partir de la correlación cofenética "Positive Matching" de los 7 genotipos de *Phaseolus lunatus* en el software info-gen. R=Rayado, PV=Pinto Violento, MV=Muy Violento, Gon=Grande Ojo Negro, Fon=Flojo Ojo Negro, BV=Blanco Violento, B=Blanco.

Se realizó un análisis de coordenadas principales (AcoP) para apreciar la distribución en la agrupación que se forma así como la cercanía genética entre los genotipos, se puede observar como en el grupo de la derecha no existe tanta dispersión entre los individuos como en los grupos de la izquierda. Los 3 grupos fueron separados por la coordenada 1, la cual aportó solo 13.9% lo cual da un total de 76.4 muy por arriba del promedio, los genotipos que en la coordenada 1 están hacia el lado derecho, indican que genéticamente están más alejados de los otros genotipos. Los 3 grupos formados tienen en común que fueron recolectados en la misma región, por ejemplo el grupo formado por los genotipos 5 y 6 cuya región es San Miguel, Totolapan, de igual manera al ser considerados como violentos es porque tienden a un crecimiento más precoz que los demás. Estos resultados obtenidos fueron similares a los que obtuvo Gil, 2018, donde se obtuvo el 48.06% de la variabilidad total, además, se formaron dos grupos separados por la primera coordenada, ambas agrupaciones correspondían a los grupos MI y MII del acervo genético mesoamericano del frijol Lima. De igual manera se relacionan con los resultados que obtuvo García-Villacís (2008) en *Phaseolus lunatus* donde, aunque solo obtuvo el 38.9% de la variabilidad total, sus genotipos

se agrupaban en dos principales grupos, los cuales correspondían al acervo genético mesoamericano y andino. La diferencia en cuanto a variabilidad genética puede deberse a que sus genotipos eran muy alejados genéticamente.

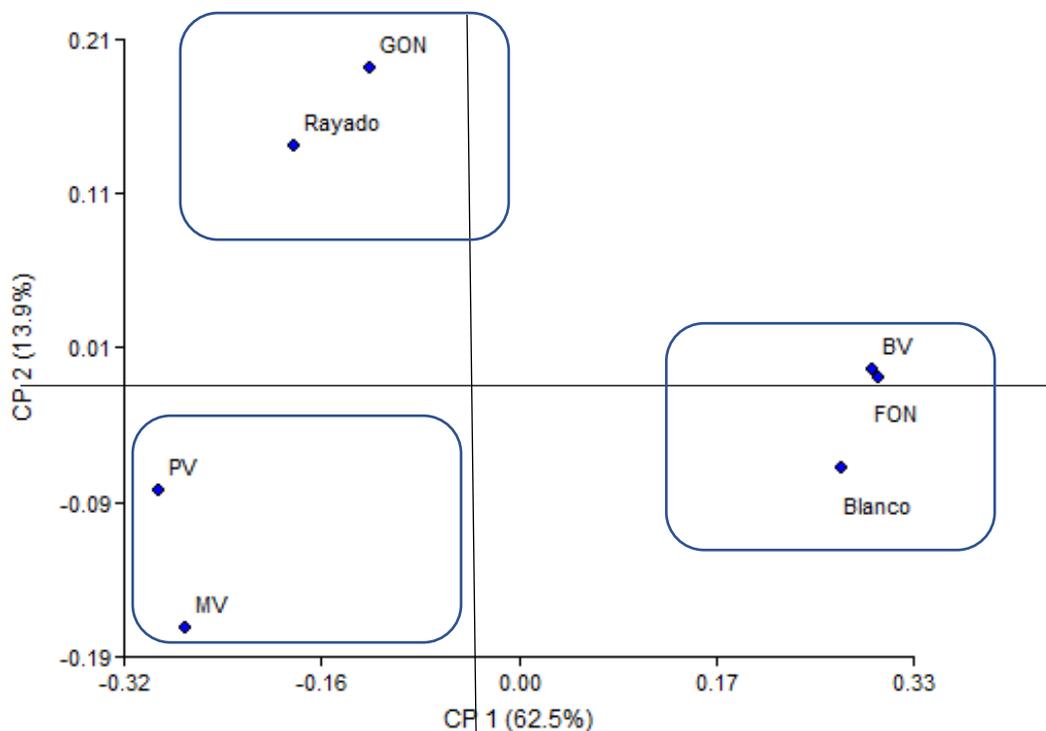


Figura 13. Coordenadas principales (AcoP) donde se observa la cercanía genética que existe entre los diferentes genotipos.

Se calculó la muestra mínima requerida para la estimación de la variable de diversidad genética a partir de los datos proporcionados al software info-gen y se graficaron esos valores en función al tamaño muestral. Se obtuvo que la muestra mínima requerida era de 5 muestras por genotipo, esto se pudo notar debido a que a 4.93 el punto máximo hace inflexión, esto puede deberse a que al ser una especie autógama, no existe tanta variabilidad genética, este dato es relevante para futuros proyectos donde se planea obtener muestras de esta misma especie.

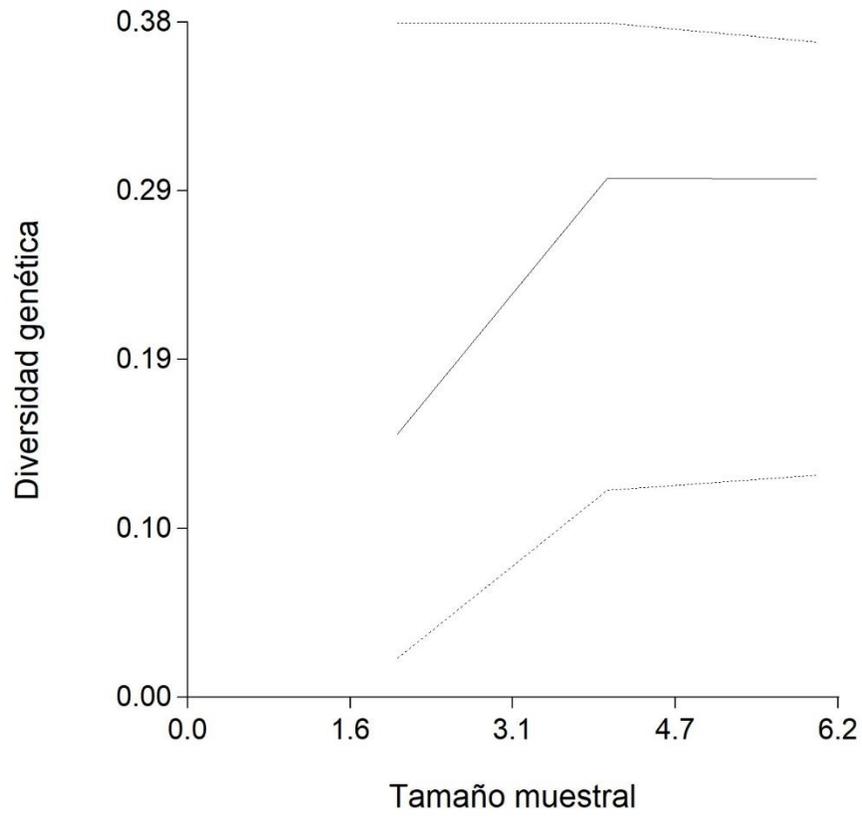


Figura 14. Número de muestras requeridas para estudio de diversidad genética obtenida con el software infogen.

V. CONCLUSIONES

El análisis de diversidad mostró que existe mayor diversidad genética entre genotipos que dentro de los genotipos de *Phaseolus lunatus* recolectados en Tierra Caliente, Guerrero. Los análisis arrojaron un 18.71% de diversidad dentro de los individuos de una misma población mientras que entre los genotipos la diversidad fue de un 81.29%, esto ocurre debido a que *Phaseolus lunatus* es una planta de tipo autógena, por lo que existe poca o nula polinización cruzada, así que hay poca variabilidad genética lo que genera que exista mayor diversidad entre los genotipos recolectados en diferentes localidades que en los individuos de la misma población.

Las bandas obtenidas por los marcadores moleculares ISSR mostraron un 100% de polimorfismo. De igual manera se observaron tres grupos principales entre los genotipos esto debido al grado de parentesco y de distancia genética que hay entre ellos por ejemplo el grupo 1 conformado por los genotipos (2 y 3) se les unían los genotipos 1 y 4 mientras que grupo 2 conformado por los genotipos (5 y 6) se les unía el genotipo 7 con mayor similitud correspondiente los genotipos agrupados poseían características en común como la localidad donde fueron recolectados, en el caso de los genotipos 5 y 6 eran de crecimiento precoz.

Los resultados determinaron que la muestra mínima requerida para estudios de diversidad en *P. lunatus* son 5 muestras era suficiente esto debido a la baja variabilidad genética que presenta la especie.

VI. LITERATURA CITADA

- Arnao, E., Perdomo, R., & Graterol, E. (2010). Diversidad genética en cultivares de soya utilizando marcadores microsatélites, EN VENEZUELA. *Interciencia*, 35(7), 534-538. <https://biblat.unam.mx/pt/revista/interciencia/articulo/diversidad-genetica-en-cultivares-de-soya-utilizando-marcadores-microsatelites-en-venezuela>
- Balzarini M, Bruno C, Peña A, Teich I, Di Rienzo J. 2010. Estadística en Biotecnología. Aplicaciones en InfoGen. Encuentro Grupo Editor. Córdoba, Argentina.
- Balzarini M, Di Rienzo J. 2004. Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. Facultad de Ciencia Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Bolívar, AM, Rojas, A., & García Lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*, 3 (1), 25-33.
- De Dios L, T., C, I., & C, V. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación En Discapacidad*, 2(2), 70-78. <https://biblat.unam.mx/es/revista/investigacion-en-discapacidad/articulo/fundamentos-de-la-reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa-pcr-y-de-la-pcr-en-tiempo-real>
- De Lourdes Sánchez Alvarez, M., De Escobar Martín, H. D. R., & Cura, N. D. (2020). Aproximación a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. *DOAJ (DOAJ: Directory Of Open Access Journals)*. <https://doaj.org/article/5499e4ace4fa4af6b2e2136a5f83aad2>
- FAO. 2018. Legumbres. Pequeñas semillas, grandes soluciones. Ciudad de Panamá. 292 páginas. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.(revisar)

- Gil, P. J. R. (2018). Estructura genética en el acervo genético Mesoamericano del Frijol Lima silvestre (*Phaseolus lunatus* var *Silvester Baudet.*) de México. Centro de investigación científica de Yucatan, A.C.
- Jessica Raquel Moscoso Alfaro Erick Ricardo Aguilar Castillo Aura Elena Suchini Farfán María Gabriela Tobar Piñón Karen Adriana Agreda Hernández. (2020, febrero). Caracterización morfológica, molecular, industrial y culinaria de ocho genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) arbustivo y voluble adaptados al occidente de Guatemala. *Programa de Consorcios de Investigación Agropecuaria CRIA*.
- Isabel Nambo Garcia, J. (2022). *Caracterización fisicoquímica y calidad de semilla de diferentes genotipos de comba (Phaseolus lunatus) de la región de Tierra Caliente, Guerrero*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- López-Alcocer, José de J., Lépiz-Ildefonso, Rogelio, González-Eguiarte, Diego R., Rodríguez-Macías, Ramón, & López-Alcocer, Eduardo. (2016). Variabilidad morfológica de *Phaseolus lunatus* L. Silvestre de la región occidente de México. *Revista fitotecnia mexicana*, 39(1), 49-58. Recuperado en 15 de agosto de 2024, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802016000100009&lng=es&tlng=
- Lorigados, S. M., Rosas-Sotomayor, J. C., Rocha, L. L. A., Pérez, R. O., Brito, M. P., & Labrada, H. R. (2005). Análisis molecular de la diversidad genética de frijol común manejada por campesinos en Cuba. *Agronomía Mesoamericana*, 17(3), 369. <https://doi.org/10.15517/am.v17i3.5172>.
- Martinez, A. R. (2014). *Variabilidad genética de frijol (Phaseolus vulgaris L.) cultivado silvestre en el estado de Durango*". Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango.

Martinez, G. T. E. (2021). Diversidad fenotípica, germinación y emergencia en semillas de ibes (*Phaseolus lunatus* L.). Instituto Tecnológico de Conkal.

Martínez-Castillo, J. (2015). Consideraciones sobre la importancia del muestreo en los estudios de la domesticación de plantas: el caso del frijol lima (*Phaseolus lunatus*) en México. *Desde el Herbario CICY*, 7, 17-22.

Martínez-Castillo, J., Heredia Pech, M., Ortíz García, M. M., Chacón

Sánchez, M.I., Andueza Noh, R. H., & Chávez Pesqueira, M. (2022). *Flujo genético e introgresión silvestre-domesticado en el frijol Lima en México*. *Siembra*, 9(3), ., México (Doctoral dissertation, Tesis de Maestría, Mauricio Heredia Pech) Pech, MH (2020). Flujo genético e introgresión entre poblaciones domesticadas y silvestres del frijol lima).

Sánchez Álvarez, María de L, Roque de Escobar Martín, Hilda D, & Delgado Cura, Norma. (2020). Aproximación a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. *Medicentro Electrónica*, 24(4), 715-720. Epub 01 de octubre de 2020. Recuperado en 28 de agosto de 2024, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30432020000400715&lng=es&tlng=es.

Morales-Santos, M. E., Peña-Valdivia, C. B., García-Esteva, A., Aguilar-Benítez, G., & Kohashi-Shibata, J. (2017). CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y DE GERMINACIÓN EN SEMILLAS Y PLÁNTULAS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) SILVESTRE, DOMESTICADO Y SU PROGENIE. *Agrociencia*, 51(1), 43-62. <https://www.redalyc.org/pdf/302/30249773005.pdf>

Morales, L. R. (mayo de 2016). *EFICIENCIA DE MARCADORES RAPD E ISSR, EN LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE Tigridia spp.* Universidad Autónoma de México.

Moro, A. *Ha/ricot de Lima* [Figura 1]. Dipartimento di Scienze Della Vita, Università di Trieste. <https://luirig.altervista.org/pics/index5.php?recn=24888&page=>

Pech, M. H. (2020). *Poblaciones Domesticadas Y silvestres del Frijol Lima (Phaseolus lunatus L). En la península de Yucatan, México*. Centro de Investigación Científica de Yucatan, A. C.

Phaseolus lunatus - ficha informativa. (s/f). Gob.mx. Recuperado el 15 de agosto de 2024, de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/phaseolus-lunatus/fichas/ficha.htm>

Pintor, E. P. R., Robelto, W. V. P., Cristancho, A. O., & Villota, M. T. O. (2020). Evaluación de la calidad de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) variedad Palicero en el banco de semillas de la Universidad Libre. *Avances Investigación En Ingeniería*, 17(1). <https://doi.org/10.18041/1794-4953/avances.1.5897>

Ramírez, M. E., Arturo, E. G. J., Adrián, H. L., & Aquiles, C. C. (2019, 1 diciembre). *Características distintivas para la descripción de variedades en frijol (Phaseolus vulgarie L.)*. <http://colposdigital.colpos.mx:8080/handle/10521/4202>

Serrano, M. L. S. (2011). *Origen y diversidad genética de las variedades cultivadas de frijol lima en Mesoamérica*. Universidad Nacional de Colombia.

Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. (s/f). *¿Qué es y en qué consiste el análisis de pureza física de las semillas?* gob.mx. Recuperado el 15 de agosto de 2024, de <http://www.gob.mx/snics/articulos/que-es-y-en-que-consiste-el-analisis-de-pureza-fisica-de-las-semillas?idiom=es>

Vargas, Elida M, Castro, Emilio, Macaya, Gabriel y J. Rocha, Oscar. (2003). Variación del tamaño de frutos y semillas en 38 poblaciones silvestres de *Phaseolus lunatus (Fabaceae)* del Valle Central de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 51 (3-4), 707-724. Recuperado el 27 de agosto de 2024, de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0077442003000300011&lng=en&tlng=es

Vidal-Barahona, A., Del Carmen Lagunes-Espinoza, L., Moctezuma, E. V., & Ortiz-García, C. F. (2006). Variabilidad morfológica y molecular de cultivares criollos y mejorados de frijol común en Tabasco, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29(4), 273-281.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61029401>

Villacís, K. I. G. (18 de agosto de 2008). *ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE Phaseolus lunatus L. EN ZONAS SILVESTRES Y CULTIVADAS EN LA PROVINCIA DE IMBABURA-ECUADOR MEDIANTE EL USO DE MICROSATÉLITES*. Escuela politécnica del ejército.