



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo
Integral Regional Unidad Durango**

**“Variabilidad genética de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado y
silvestre en el estado de Durango”**

TESIS

Que para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias en Biotecnología

Presenta:

Alfonso Reyes Martínez

Dirigida por:

Dra. Norma Almaraz Abarca

Dra. Tzayhri Gallardo Velázquez



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 11:00 horas del día 13 del mes de noviembre del 2014 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del: CIIDIR-IPN Unidad Durango para examinar la tesis titulada:

Variabilidad genética de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado y silvestre en el estado de Durango

Presentada por el alumno:

Reyes	Martínez	Alfonso
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
		Con registro:
		A 1 1 0 3 9 3.

aspirante de:

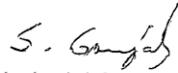
Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA


Dra. Norma Almaraz Abarca
Director de tesis


Dra. Tzayhri Guadalupe Gallardo Velázquez
Director de tesis


Dra. María del Socorro González Elizondo


Dra. Yolanda Herrera Arrieta


Dra. Martha Isabel Torres Morán


Dr. José Antonio Ávila Reyes

PRESIDENTE DEL COLEGIO
PROFESORES




Dr. José Antonio Ávila Reyes
CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 7 de Junio del 2011

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Durango en su sesión ordinaria No. 6 celebrada el día 7 del mes de Junio conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

REYES	MARTÍNEZ	ALFONSO
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre (s)
Con registro:		
A	1	1 0 3 9 3

Aspirante de: DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
Variabilidad genética de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado y silvestre en el Estado de Durango.

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dra. Norma Almaraz Abarca y Dra. Tzayhri Gallardo Velázquez

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:
CIIDIR-IPN Unidad Durango
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

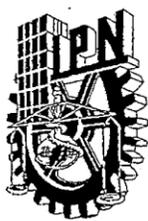
Directores de Tesis

Dra. Norma Almaraz Abarca
Aspirante

M. en I. A. Alfonso Reyes Martínez

Dra. Tzayhri Gallardo Velázquez
Presidente del Colegio

Dr. Jose Antonio Reyes
CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
RESERVO INTEGRAL REGIONAL
CIIDIR-IPN
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Durango, Dgo., el día 13 del mes de **Noviembre** del año **2014**, la que suscribe el alumno del Programa de **Doctorado en Ciencias en Biotecnología**, con número de registro **A110393**, adscrito al **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango. CIIDIR-IPN Unidad Durango**, manifiesta que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Norma Almaraz Abarca** y la **Dra. Tzayhri Guadalupe Gallardo Velázquez** cede los derechos del trabajo titulado **“Variabilidad genética de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado y silvestre en el estado de Durango”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones alfito2819@yahoo.com, noralab@yahoo.com y gtzavhri@yahoo.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

ALFONSO REYES MARTÍNEZ

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional unidad Durango (IPN CIIDIR Durango) y en el Laboratorio de Investigación I de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Doctora Norma Almaraz Abarca y la Doctora Tzayhri Gallardo Velázquez, así como en las instalaciones del Laboratorio de Marcadores Moleculares (IMAREFI) del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara (UdG), bajo la dirección de la Doctora Martha Isabel Torres Moran.

DEDICATORIA

A Zadhira, gracias por estar siempre a mi lado, apoyandome y dándome animos en los momentos más complicados para la terminación de este proyecto. Te amo.

Mariana y Marco Alfonso, gracias por acompañarme a regar mis plantitas y darle un nuevo sentido a esta acción.

A mis padres, gracias por su apoyo y por todas esas lecciones de vida que me inculcaron y que en un principio no tenían sentido, las cuales ahora rinden frutos.

Un profundo y grato agradecimiento a todas las personas que me ayudaron con este trabajo, compartiendo su tiempo, su conocimiento y su gran experiencia, ya que con su sencillez y humildad me permitieron obtener logros inimaginables en el ámbito académico.

GRACIAS

Contenido

Relación de figuras	ix
Relación de tablas	xi
Glosario	xiii
Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
1. Antecedentes	6
1.1 Aspectos biológicos de <i>Phaseolus vulgaris</i>	6
1.2 Marcadores moleculares	8
1.2.1 Tipos de marcadores moleculares	10
1.2.1.1 SSR o microsatélites	10
1.2.1.2 Secuencias espaciadoras de microsatélites (ISSR)	11
1.2.1.3 Estudios moleculares sobre frijol común	12
1.3 Marcadores químicos (perfiles fenólicos)	13
2. Justificación	15
3. Objetivo	15
4. Materiales y métodos	16
4.1 Material vegetal	17

4.2 Caracterización morfológica	18
4.3 Análisis molecular	18
4.3.1 Modificación del protocolo de extracción de ADN de Coelho <i>et al.</i> (2009)	18
4.3.2 Modificación del protocolo de extracción de ADN de Keb-Llanes <i>et al.</i> (2002)	19
4.3.3 Cuantificación del ADN obtenido	20
4.3.4 Pureza del ADN obtenido	20
4.3.5 Apreciación del tamaño molecular y de la integridad del ADN obtenido	21
4.3.6 Amplificación de SSR por PCR	21
4.3.7 Amplificación de ISSR por PCR	21
4.4 Análisis químico	22
4.4.1 Preparación de los extractos fenólicos foliares	22
4.4.2 Determinación de fenoles totales	23
4.4.3 Determinación de flavonoides totales	23
4.4.4 Análisis HPLC-DAD	24
4.5 Actividad antioxidante	24
4.5.1 Bloqueo del radical libre DPPH*	24
4.5.2 Capacidad antioxidante total (CAT)	25
4.5.3 Poder reductor de hierro (PR)	26

4.6 Análisis de datos	26
5. Resultados y discusión	27
5.1 Características morfológicas	27
5.2 Análisis molecular	33
5.2.1 Extracción de ADN	33
5.2.2 Análisis de SSR	34
5.2.3 Análisis de ISSR	44
5.3 Caracterización química	51
5.3.1 Contenido de fenoles y flavonoides	51
5.3.2 Composición fenólica	52
5.3.3 Variación de los perfiles fenólicos foliares	55
5.3.4 Capacidad antioxidante.	59
6. Conclusiones	60
7. Sugerencias	62
8. Referencias bibliográficas	63
9. Anexos	75

Relación de figuras

Fig. 1. Localización de las zonas donde se han encontrado semillas de frijol en el Continente Americano (Tomado de Berglund-Brucher y Brucher, 1976).	7
Fig.2 Desarrollo experimental y tiempos de análisis.	16
Fig. 3. Resultados de un análisis de agrupamiento comparando el peso, largo, ancho, y grosor de las semillas de <i>Phaseolus coccineus</i> y de 35 variedades de frijol común. Los números corresponden a los nombres de las muestras de la Tabla 1.	32
Fig 4. Gel de agarosa al 0.8% de muestras de ADN obtenidas a partir de tejido foliar de 10 individuos de frijol variedad Pinto Saltillo con el método modificado de Coelho <i>et al.</i> (2009) (izquierda) y de los mismos individuos con el método modificado de Keb-Llanes <i>et al.</i> (2002) (derecha). Se aprecia la baja migración y la relativamente baja degradación (fondo fluorescente tenue a lo largo de los carriles).	34
Fig 5. Dendrograma basado en las secuencias amplificadas por el par de iniciadores BM53/AF483849 de SSR en 35 variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> y en <i>P. coccineus</i> . Los números corresponden a las muestras descritas en la Tabla 1.	37
Fig 6. Dendrograma basado en las secuencias amplificadas por el par de iniciadores BM210/AF483902 de SSR en 35 variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> y en <i>P. coccineus</i> . Los números corresponden a las muestras descritas en la Tabla 1.	38
Fig 7. Dendrograma basado en las secuencias amplificadas por el par de iniciadores GATS91/AF483842 de SSR en 35 variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> y en <i>P. coccineus</i> . Los números corresponden a las muestras descritas en la Tabla 1.	38
Fig 8. Dendrograma basado en las secuencias amplificadas por el iniciador 899 de ISSR en 35 variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> y en <i>P. coccineus</i> . Los números corresponden a las muestras descritas en la Tabla 1.	47
Fig 9. Dendrograma basado en las secuencias amplificadas por el iniciador 814 de SSR en 35 variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> y en <i>P. coccineus</i> . Los números corresponden a las muestras descritas en la Tabla 1.	47
Fig 10. Dendrograma basado en las secuencias amplificadas por los iniciadores 814 y 899 en 36 muestras de <i>Phaseolus</i> . Los números corresponden a las muestras descritas en la Tabla 1.	51

Fig. 11 Resultados de un análisis de agrupamiento comparando los perfiles fenólicos foliares de 32 variedades de *Phaseolus vulgaris* y de *P. coccineus*.

58

Relación de tablas

Tabla 1. Cultivares de <i>Phaseolus vulgaris</i> analizados en el presente estudio.	17
Tabla 2. Peso promedio de 100 semillas de 35 variedades de frijol común y de <i>Phaseolus coccineus</i> .	27
Tabla 3. Largo promedio de la semillas de 35 variedades de frijol común y de <i>Phaseolus coccineus</i> .	29
Tabla 4. Grosor promedio de las semillas de 35 variedades de frijol común y de <i>Phaseolus coccineus</i> .	30
Tabla 5. Ancho promedio de las semillas de 35 variedades de frijol común y de <i>Phaseolus coccineus</i> .	31
Tabla 6. Valores de A_{260} , A_{260}/A_{280} , y concentración de ADN de 10 muestras de frijol de la variedad Pinto Saltillo obtenido por los métodos de Coelho <i>et al.</i> (2009) y Keb-Llanes <i>et al.</i> (2002).	33
Tabla 7. Resumen de la caracterización de los iniciadores de microsatélites BM53/AF483849, BM210/AF483902, y GATS91/AF483842, usados con 35 variedades de frijol común y de <i>Phaseolus coccineus</i> .	35
Tabla 8. Loci amplificados por el par de iniciadores SSR BM53/AF483849 en 35 variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> y en <i>P. coccineus</i> .	40
Tabla 9. Loci amplificados por el par de iniciadores SSR BM210/AF483902 en 35 variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> y en <i>P. coccineus</i> .	41
Tabla 10. Loci amplificados por el par de iniciadores SSR GATS91/AF483842 en 35 variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> y en <i>P. coccineus</i> .	42
Tabla 11. Diversidad génica (índice de Shannon, H y polimorfismo, P) obtenidos para 35 variedades de frijol común y <i>Phaseolus coccineus</i> , con los iniciadores de microsatélites BM210/AF483902, BM53/AF483849, y GATS91/AF483842.	43
Tabla 12. Resumen de la caracterización con los iniciadores ISSR 899 y 814 de 35 variedades de frijol común y <i>Phaseolus coccineus</i> .	45
Tabla 13. Loci amplificados por el iniciador ISSR 899 en 35 variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> y en <i>P. coccineus</i> .	48

Tabla 14. Loci amplificados por el iniciador ISSR 814 en 35 variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> y en <i>P. coccineus</i> .	49
Tabla 15. Diversidad génica (índice de Shannon, H y polimorfismo, P) obtenidos para 35 variedades de frijol común y <i>Phaseolus coccineus</i> , con los iniciadores ISSR 899 y 814.	50
Tabla 16. Fenoles totales, flavonoides totales, actividad bloqueadora de radicales libres (EC ₅₀), capacidad antioxidante total (TAC) y potencial reductor de hierro (RP) de extractos foliares de plantas de 26 días de 32 variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> y de <i>Phaseolus coccineus</i> .	53
Tabla 17. Matriz binaria construida con los perfiles fenólicos de cada una de las 36 muestras de <i>Phaseolus</i> .	56

Glosario

A	Absorbancia
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DPPH*	Radical libre 2,2-difenil -1-picrilhidrazil
EDTA	Etilendinitrilotetracetato disodico
EC ₅₀	Concentración eficiente al 50%
H	Indice de Shannon
HPLC/DAD	Cromatografía líquida de alta presión con detector de arreglo de diodos
ISSR	Secuencias espaciadoras de microsatélites
mg EAG	Miligramos equivalentes de ácido gálico
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIC	Contenido de información polimórfica
QE	Quercetina
RAPD	ADN polimórfico aleatoriamente amplificado
RFLP	Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción
RP	Poder reductor
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SSR	Secuencias simples repetidas (microsatélites)

SSRm	Microsatélites mitocondriales
SSRc	Microsatélites de cloroplasto
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
TAC	Capacidad antioxidante total
TE	Tris-EDTA
TR	Tiempo de retención
Tris-HCl	Tris (hidroximetil)aminometano-ácido clorhídrico

Resumen

En México, el frijol común ha sido caracterizado agrónomica y morfológicamente, pero existen pocos trabajos enfocados a la caracterización molecular o química. El presente estudio pretende contribuir a caracterizar molecular y químicamente 32 variedades cultivadas y tres formas silvestres de *Phaseolus vulgaris* L. Con fines comparativos se analizó *Phaseolus coccineus* L. La caracterización molecular se realizó con tres iniciadores codominantes SSR (microsatélites) y dos iniciadores dominantes ISSR. Los respectivos perfiles de amplificación se obtuvieron con protocolos particulares de PCR y electroforesis en geles de agarosa teñidos con SybrGreen para la separación y visualización de los loci SSR, y electroforesis en geles de acrilamida teñidos con sales de plata para la separación y visualización de los loci ISSR. Con los loci amplificados y caracterizados por su tamaño molecular (pb) se elaboraron matrices binarias de presencia/ausencia (1/0), que se sometieron a análisis de agrupamiento. Con las mismas matrices se calcularon los parámetros indicadores del potencial informativo de los marcadores y de la variabilidad genética de las muestras de *Phaseolus* (índice de polimorfismo, contenido de información polimórfica, e índice de diversidad de Shannon). Ambos tipos de marcadores moleculares revelaron niveles bajos de variabilidad genética en todas las muestras de *Phaseolus*, pero comparativamente los microsatélites indicaron que las formas silvestres de *P. vulgaris* tienen mayor variabilidad genética que las variedades cultivadas y que *P. coccineus*. Los marcadores ISSR permitieron tipificar las variedades cultivadas de frijol común y en general, discriminaron las formas silvestres de las cultivadas. La caracterización química se realizó determinando los perfiles fenólicos foliares de las muestras de *Phaseolus* en plántulas de 26 días de edad. Los perfiles se determinaron con un método en gradiente de HPLC-DAD, obteniendo información estructural de cada compuesto resuelto en los cromatogramas a partir de los tiempos de retención y de las características espectrales en UV. Los perfiles fenólicos de cada muestra estuvieron formados por los compuestos resueltos en los respectivos

cromatogramas; con los perfiles se construyó una matriz binaria de presencia/ausencia, que se sometió a un análisis de agrupamiento. Los resultados de la caracterización química indicaron que las hojas de *Phaseolus* presentan una riqueza y diversidad relevantes de compuestos fenólicos, siendo los más importantes los derivados 3-O-glicósidos de los flavonoles quercetina y canferol en el frijol común y los derivados 7-O-glicósidos de las flavonas apigenina y luteolina en *P. coccineus*. Los perfiles fenólicos foliares fueron especie-específicos y también varietal-específicos para *P. vulgaris*, de tal manera que esos perfiles son quimiomarcadores útiles para la tipificación y determinación de la autenticidad de variedades de frijol común. Las hojas de *Phaseolus vulgaris* representan una fuente importante de antioxidantes naturales y de sustancias anticancerígenas.

Palabras claves: *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus coccineus*, SSR, ISSR, composición fenólica.

Abstract

In Mexico, the common bean has been characterized agronomically and morphologically, but there are few reports focused on the molecular or chemical characterizations. The goal of the present study was to contribute in the molecular and chemical characterization of 32 cultivars and three wild forms of *Phaseolus vulgaris* L. were characterized molecular and chemically. For comparison *P. coccineus* was analyzed. Molecular characterization was performed with three codominant primers SSR (microsatellites) and two dominant ISSR primers. The respective amplification profiles were obtained with particular protocols PCR and electrophoresis in agarose gels stained with SybrGreen for separation and visualization of SSR loci, and acrylamide gel electrophoresis stained with silver salts for separation and visualization of ISSR loci. With the amplified and molecular size-characterized (pb) loci, binary matrices presence/absence (1/0) were constructed, which were subjected to cluster analysis. With those same matrices, indicators of informative potential of markers and genetic variability of samples of *Phaseolus* (polymorphism, polymorphic information content, and Shannon diversity index) were calculated. Both types of molecular markers revealed low levels of genetic variability in all samples of *Phaseolus*, but comparatively microsatellites indicated that the wild forms of *P. vulgaris* have higher genetic variability than cultivated varieties and *P. coccineus*. The ISSR markers allowed typifying the common bean cultivars and in general, they discriminated the wild forms from the cultivated. The chemical characterization was done by determining the leaf profiles phenolic of *Phaseolus* samples by using seedlings 26 days of age. Profiles were obtained on a gradient HPLC-DAD method, getting structural information of each resolved compound in the chromatograms from the retention times and UV spectral characteristics. Phenolic profiles of each sample were formed by the compounds in the respective chromatograms; with the profiles a binary matrix of presence/absence was constructed, which was subjected to a cluster analysis. The results of the chemical characterization indicated that *Phaseolus* leaves have

important richness and variety of phenolic compounds, being the most important the 3-*O*-glycosides derivatives of the flavonols quercetin and kaempferol in common beans, and the 7-*O*-glycosides derivatives of the flavones apigenin and luteolin in *P. coccineus*. Foliar phenolic profiles were species-specific and varietal-specific for *P. vulgaris*, so that these profiles are useful chemomarkers for the identification and determination of the authenticity of varieties of common bean. *Phaseolus vulgaris* leaves an important source of natural antioxidants and anticancer compounds.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus coccineus*, SSR, ISSR, phenolic composition.

Introducción

Una de las principales actividades agrícolas en México es la producción de frijol. En el año 2012, la producción fue de 1 038 763 toneladas, siendo el estado de Durango el segundo productor nacional con 108 584 toneladas, lo que significa el 10.5% de la producción total (CEFP, 2013).

El frijol común en México ha sido caracterizado principalmente en términos morfológicos y agronómicos. El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar de manera molecular y química, 32 variedades cultivadas y tres formas silvestres de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) para estimar el potencial de marcadores moleculares y químicos para tipificar variedades cultivadas, para evaluar el estatus de variabilidad genética de las mismas y su relación con formas silvestres, y para evaluar el potencial del tejido foliar de *Phaseolus* como fuente de compuestos útiles. *Phaseolus coccineus* se analizó de la misma manera con fines comparativos.

Los marcadores moleculares son herramientas que permiten estimar la variabilidad genética de las poblaciones de los diversos organismos. La estimación de la variabilidad genética es un parámetro importante en los programas de conservación de recursos naturales, también contribuye a establecer los límites específicos, lo cual es un aspecto importante porque las especies son las unidades básicas de la diversidad.

La caracterización química de los recursos vegetales tiene implicaciones taxonómicas, principalmente la síntesis de los metabolitos secundarios, y dentro de esos, los compuestos fenólicos, porque la composición de esos compuestos tiende a ser especie-específica. También tiene implicaciones en la búsqueda de compuestos útiles que tengan propiedades benéficas en la salud humana y en la de los animales, ambas han sido encontradas para los flavonoides y ácidos fenólicos.

1. ANTECEDENTES

1.1 Aspectos biológicos de *Phaseolus vulgaris*

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) pertenece a la familia Fabacea (Leguminosae), subfamilia Papilionoideae, tribu Phaseolae, género *Phaseolus*, especie *vulgaris*. Es una especie anual; diploide ($2n = 2x = 22$) (Singh *et al.*, 1991); autógama, aunque puede presentar polinización cruzada en niveles que van desde menos del 1% (Ortega, 1974; Tucker y Harding, 1975; Park *et al.*, 1996) hasta valores tan altos como el 66% (Wells *et al.*, 1988) dependiendo del tipo de cultivar y condiciones ambientales, entre otros (McCormack, 2006).

La diversificación y domesticación del frijol común ocurrió en la región que hoy ocupa México y Guatemala (Miranda Colín, 1968; Kwak *et al.*, 2009; Bitochi *et al.*, 2013). Junto con el maíz (*Zea mays*), el frijol fue uno de los principales alimentos de la dieta de las culturas prehispánicas de Mesoamérica (Reyes *et al.*, 2008) , su importancia ha sido preservada hasta la actualidad.

Phaseolus vulgaris silvestre crece en México y en la región Andina (Kaplan, 1981); Gepts (1986) menciona que la domesticación del frijol común se dio antes de que existiera un contacto cultural entre Mesoamérica y esa región sur del continente Americano, el cual ocurrió aproximadamente entre 2000 y 1000 años antes de la era actual.

Evidencias arqueológicas de la domesticación del frijol común en Mesoamérica se encontraron en una cueva de Coxcatlan en el Valle de Tehuacán, Puebla, México, las cuales tienen una antigüedad de 5500 a 7000 años antes de la era presente. Las evidencias de la zona Andina fueron encontradas en Guitarrero, Perú, con una antigüedad de 8000 años antes de la era presente; y algunas formas silvestres fueron encontrados en Mesoamérica pero no en los Andes (Kaplan, 1981) (Figura 1).



Fig. 1. Localización de las zonas donde se han encontrado semillas de frijol en el Continente Americano (Tomado de Berglund-Brucher y Brucher, 1976).

El género *Phaseolus* es originario del Continente Americano (Kaplan y Lynch, 1999; Freytag y Debouck, 2002), incluye alrededor de 70 especies (Freytag y Debouck, 2002), de las cuales cerca de cincuenta crecen en México (Reyes *et al.*, 2008). Cinco especies han sido domesticadas y son cultivadas en mayor o menor grado a través del mundo: *Phaseolus vulgaris*, *P. lunatus* L., *P. coccineus*, *P. acutifolius* A. Gray, and *P. polyanthus* Greenman (Gepts, 2001). Desde los puntos de vista, económico, agrícola, social y nutricional, la especie más importante de *Phaseolus* es *Phaseolus vulgaris* (Gepts *et al.*, 2008; Acosta-Gallegos *et al.*, 2007).

En México, el frijol común se cultiva desde Chihuahua hasta Chiapas, a través de la Sierra Madre Occidental y del Eje Neovolcánico del centro de México (Acosta-Gallegos *et al.*, 2007). En el estado de Durango las poblaciones silvestres crecen bajo condiciones semiáridas, con precipitaciones anuales muy bajas (35 mm) y en altitudes cercanas a los 2200 m, condiciones que contrastan con las que predominan en el estado de Chiapas, donde las poblaciones naturales son encontradas en lugares con precipitaciones de 2000 mm y altitudes de 800 m; esta capacidad de crecimiento en condiciones ambientales muy variables sugiere que *P. vulgaris* tiene una alta capacidad biológica asociada a una variabilidad genética importante (Acosta-Gallegos *et al.*, 2007).

1.2 Marcadores Moleculares

El uso de las técnicas moleculares ha tenido dos consecuencias de importancia en la biología molecular, la primera es que se han generado herramientas para uso general en los análisis genéticos básicos y aplicados y la segunda es que ha ofrecido un campo más amplio y completo de la variabilidad genética y su distribución en poblaciones y especies (Pérez de la Vega, 1997).

Las herramientas que se usan para llevar a cabo los análisis moleculares son los marcadores genéticos. Rieger *et al.* (1982) los definen como cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente utilizada en el análisis genético y Gale (1994) los define como cualquier medio para identificar loci específicos en un cromosoma. Para esto se puede utilizar un gen, una parte de éste, o cualquier secuencia sea codificante o no, que sea fácilmente observable después de ser amplificadas por medio de la PCR o/y después de ser digeridas con enzimas de restricción (Pérez de la Vega, 1993).

Los marcadores bioquímicos y moleculares se usan en los estudios evolutivos y de genética de poblaciones (Pérez de la Vega, 1993) y en programas de mejoramiento de especies de plantas cultivadas (Arús y Moreno-González, 1993).

Los marcadores moleculares además son herramientas con un amplio uso en diferentes campos de la ciencia (biomedicina, biología, estudios de diversidad genética, ciencias forenses); actualmente hay varias técnicas moleculares que nos permiten detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y pueden ser dominantes o co-dominantes (Simpson, 1997).

Los marcadores moleculares que han sido más usados para evaluar la diversidad genética en diferentes especies y variedades de plantas son RAPD (Marotti *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2006), RFLP (Nodari *et al.*, 1992), ISSR (Svetleva *et al.*, 2006), y microsatélites o SSR (Guerra-Sanz, 2006; Gaitán-Solís *et al.*, 2002.; Yu *et al.*, 2000; Coelho *et al.*, 2009).

Para llevar a cabo este tipo de estudios moleculares se debe contar con un protocolo de aislamiento de ADN, el cual permita obtenerlo de forma pura y en cantidad suficiente; de manera comercial existen kits que garantizan el aislamiento de ADN para una gama amplia de especies, sin embargo en algunos laboratorios se prefiere estandarizar el método según la especie a estudiar, debido a que la cantidad o calidad del ADN obtenido mediante los kits, muchas veces no es el adecuado, además que su costo es elevado.

En la actualidad existen diferentes métodos para aislar ADN total de diferentes especies vegetales, algunos de ellos consumen mucho tiempo y son complicados, se hace uso de dos solventes orgánicos como el cloroformo y el fenol, y de procesos de diálisis para la purificación de ADN, como el desarrollado por Herrmann (1982); o el desarrollado por Palmer (1987), el cual es un poco más corto que el de Herrmann (1982) por no incluir un paso de diálisis. Otros protocolos son muy largos como el reportado por Rogers y Bendich (1988), ya que requieren ultracentrifugación en gradientes de cloruro de cesio por un tiempo aproximado de 12 a 16 horas y pasos igualmente extensos de diálisis para poder eliminar de las muestras de ADN el cloruro de cesio.

El uso de detergentes catiónicos como el CTAB en los reguladores de extracción de ADN en lugar del SDS por Saghai-Marroof *et al.* (1984) simplificó y redujo el

tiempo necesario para el aislamiento del ADN en especies vegetales; el CTAB precipita los ácidos nucleicos como sales insolubles de CTAB en presencia de concentraciones bajas de cloruro de sodio, reduciendo la precipitación de proteínas contaminantes y polisacáridos, incluyendo las nucleasas, lo cual permite disminuir el riesgo de degradación del material genético (Saghai-Marooft *et al.*, 1984).

Algunas especies pueden ser recalcitrantes para poder aislar el ADN en su forma pura, ya que pueden contener altas cantidades de compuestos fenólicos o polisacáridos, los cuales son difíciles de separar del material genético (Tibbits *et al.*, 2006; Cota-Sánchez *et al.*, 2006) y que inhiben enzimas, como la ADN polimerasa que es requerida para la amplificación del material genético por PCR (Kim *et al.*, 1997); para la eliminación de fenoles es necesario agregar a los reguladores de aislamiento compuestos como la PVP, la cual absorbe esos compuestos, y sustancias caotróficas (desnaturalizantes) como el 2-mercaptoetanol, el cual inhibe la acción de enzimas fenoloxidasas (Scopes, 1994).

Para las muestras de *Phaseolus* analizadas en el presente estudio, el uso de CTAB en el regulador de extracción de ADN permitió obtener material genético en cantidad y calidad adecuadas.

1.2.1 Tipos de marcadores moleculares

1.2.1.1 SSR o microsatélites

Los SSR o microsatélites son secuencias de ADN formadas de 1 a 4 (Litt y Luty, 1989) o 5 (Ponciano-Samayoa *et al.*, 2009) pares de bases, tales como; mononucleótidos (T)_n, dinucleótidos (AT)_n, tetranucleótidos (AAGG)_n; se encuentran en regiones codificantes y no codificantes del ADN.

Los microsatélites han sido detectados tanto en plantas como en animales y se han utilizado para estudios de variación genética intra e interespecífica (Edwards *et al.*, 1991; Queller *et al.*, 1993; Devey *et al.*, 1996) y para determinar linajes

(Queller *et al.*, 1993). Los microsatélites también se encuentran en el genoma de cloroplasto (SSRc) (Powell *et al.*, 1995; Vendramín *et al.*, 1996) y en el de mitocondria (SSRm) (Soranzo *et al.*, 1999), estos últimos han ayudado a los estudios evolutivos, ya que los organelos tienen herencia uniparental y no están sujetos a recombinación, por esto los cambios que se pueden observar en las poblaciones solo se deben a los procesos demográficos y de mutación (Echt *et al.*, 1998), lo que facilita dar respuesta a preguntas de tipo evolutivo relacionadas con el flujo genético (Vendramín *et al.*, 1998) y a determinar patrones evolutivos en el proceso histórico del origen de las especies (Golstein *et al.*, 1996). Otras características de los microsatélites son su alto grado de polimorfismo, su segregación de manera mendeliana y su codominancia (Golstein y Pollock, 1994; Vendramín *et al.*, 1996); la presencia de un solo locus genético hace que la lectura de las bandas sea clara y fácil de interpretar y son selectivamente neutros (Rentarúa Alcántara, 2007). Son específicos para ciertos grupos de especies y homólogos entre sí (Vendramín *et al.*, 1996), esto ayuda a hacer estudios comparativos entre especies y géneros de una misma familia. Wiessenbach *et al.* (1992) y Weber y Wong (1993) mencionan que los microsatélites del ADN nuclear contienen tasas de mutación en un intervalo de 1×10^{-3} a 1×10^{-6} , siendo estos valores más altos que los obtenidos para ADN de cloroplasto, los cuales están en un intervalo que va de 3.2×10^{-5} a 7.9×10^{-5} (Provan *et al.*, 1999), el conocer estas tasas de mutación da la base para realizar estudios de genealogía de las poblaciones.

1.2.1.2 ISSR

Los ISSR son un tipo de marcador molecular que permite determinar variación en el genoma; los primers o iniciadores que se utilizan para amplificarlos por PCR son por lo general dinucleótidos ó trinucleótidos (Culley y Wolfe, 2001), esas regiones consisten de repeticiones con motivos tales como $(CT)_n$ o $(CA)_n$, pero también pueden ser trinucleótidos, tetranucleótidos y pentanucleótidos (González y Aguirre,

2007). La separación de las secuencias amplificadas ISSR se puede hacer por electroforesis en geles de agarosa o acrilamida, porque los tamaños de esas secuencias van de 100 – 2500 pb (Bornet y Branchard, 2001) y por lo general exhiben alto nivel de polimorfismo, esta variación alélica consiste en la presencia o ausencia de los productos amplificados. Los ISSRs han sido utilizados desde 1994 en especies cultivadas y a partir de 1998 se han utilizado en estudios de la variación poblacional (Wolfe *et al.*, 1998; Wolfe y Liston, 1998). Algunos autores diseñan iniciadores que poseen secuencias nucleotídicas extras en los extremos 3' o 5', afines a los microsatélites a amplificar para mejorar la eficiencia de amplificación (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Los ISSR pueden amplificar de 25 a 50 bandas en una sola reacción y los patrones que se generan se consideran la “huella digital genética” de los individuos analizados (González y Aguirre, 2007). Polimorfismo entre individuos de una misma población es detectable con ISSR, ya que son sensibles a la presencia-ausencia de los elementos genómicos reconocidos por el iniciador así como la longitud de la secuencia intermedia amplificada (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

1.2.1.3 Estudios moleculares sobre frijol común

La mayoría de las variedades que se encuentran en México se han caracterizado principalmente de manera agronómica y morfológica (Vidal-Barahona *et al.*, 2006; Vargas-Vázquez *et al.*, 2008). La caracterización molecular en variedades regionales y económicamente importantes se ha llevado a cabo para colecciones de la Península Ibérica (Rodiño *et al.*, 2006), Honduras (Guachambala-Cando y Rosas-Sotomayor, 2010), Bulgaria (Svetleva *et al.*, 2006), y Portugal (Coelho *et al.*, 2009). A pesar de la importancia que este cultivo tiene para México, que es su centro de origen y diversificación, y las ventajas de los marcadores moleculares como herramientas de autenticidad de variedades, monitoreo de pureza y mejoramiento genético asistido, en México se han llevado a cabo pocos estudios

al respecto, entre ellos están los de Vidal-Barahona *et al.* (2006), Vargas-Vázquez *et al.* (2008), y Ramírez Pérez (2001).

La caracterización molecular en especies cultivadas representa una herramienta de autenticidad de las mismas (Métais *et al.*, 2002; Masi *et al.*, 2003), el conjunto de datos que ofrecen ayuda a monitorear el grado de cruzamiento entre variedades cultivadas. La caracterización molecular de especies vegetales es una valiosa herramienta para estimar el nivel de pureza genética de variedades, para estimar la variabilidad genética dentro y entre variedades, el mapeo asistido de genes, y realizar estudios evolutivos (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009).

1.3 Marcadores químicos (perfiles fenólicos)

La caracterización química de las especies vegetales revela información importante sobre el tipo, la diversidad, y la riqueza de los compuestos químicos que son producto del metabolismo secundario. Muchos de esos compuestos son sintetizados y acumulados en los tejidos vegetales con patrones típicos dentro de grupos de plantas.

Uno de los grupos más importantes de metabolitos secundarios son los compuestos fenólicos, su importancia radica en que son los más abundantes y diversos en el reino vegetal (Markham, 1982), tienen potentes y diversas actividades biológicas (Almaraz-Abarca *et al.*, 2007; Ksouri *et al.* 2009; Berger *et al.*, 2012), y debido a que su síntesis y acumulación se ven poco afectadas por condiciones ambientales variables (Markham, 1982) y tienen una tendencia especie-específica (Almaraz-Abarca *et al.*, 2006) son utilizados para la tipificación y autenticidad de productos de origen vegetal destinados al consumo humano (Hernández *et al.*, 2007), se han propuesto como indicadores de control de calidad de plantas medicinales (Veit *et al.*, 1995) y de alimentos de origen vegetal (Campos *et al.*, 1997), y se han usado en estudios taxonómicos de plantas (Abdala y Seelimann, 1995; Fiasson *et al.*, 1997; Almaraz-Abarca *et al.*, 2013a,b).

Los metabolitos secundarios de origen fenólico se caracterizan por tener un anillo aromático con un radical hidroxilo. La mayoría de estos, y principalmente los flavonoides, tienen propiedades con implicaciones de carácter médico (Berghe 2012; Joven *et al.*, 2012; Mouren *et al.*, 1994), siendo la capacidad antioxidante uno de los más importantes, debido a que los oxidantes están vinculados a daños al ADN, proteínas, y lípidos, entre otras moléculas que generan desordenes cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas (Rajadurai y Prince, 2007; Ames *et al.*, 1993) y cáncer (Marino y Bulzomi, 2009). Esas propiedades permiten apreciar a los flavonoides como importantes antioxidantes que pueden ser usados en la industria alimenticia, como alternativas a los sintéticos, los cuales son tóxicos y carcinogénicos (Madhavi y Salunkhe, 1995).

La composición de flavonoides en *Phaseolus vulgaris* ha sido estudiada principalmente en semillas, debido a que estas son comestibles (Beninger y Hosfield, 1999; Romani *et al.*, 2004; Dinelli *et al.*, 2006). La determinación de la composición de flavonoides en tejidos foliares ha recibido poca atención, probablemente debido a que las hojas no son consumidas por el ser humano; sin embargo, tendría importancia para la salud animal, considerando la relevancia de los fenoles vegetales como sustancias nutraceuticas (Tapas *et al.*, 2008) y que las hojas de las plantas de frijol común se usan en la elaboración de forraje para el ganado. Entre los estudios llevados a cabo para determinar la composición fenólica en hojas de frijol común se encuentra el de Kucera *et al.* (2003), quienes reportaron el incremento en la síntesis de flavonoides en material foliar como resultado de la radiación UV.

2. Justificación

México, como centro de diversificación y domesticación del frijol común, el cual ha tenido una relevancia particular en la alimentación de los grupos humanos de Mesoamérica desde tiempos prehispánicos, cuenta con una diversidad muy alta de cultivares y formas silvestres que representan una riqueza genética y cultural poco encontrada en otras relaciones país-planta. Esa riqueza genética y cultural, asociada al frijol común, se manifiesta a lo largo de todo el país, en las diferentes regiones con condiciones ambientales contrastantes donde crece silvestre o se cultiva. Sin embargo, en México la mayoría de las colecciones de germoplasma de esa especie no ha sido caracterizada de forma molecular ni química, y solo lo han sido de forma morfológica y agronómica. La caracterización molecular y la caracterización química permiten determinar la variabilidad genética dentro y entre cultivares y formas silvestres de frijol, obteniendo información que ayude a explicar el potencial de respuesta biológica que *Phaseolus vulgaris* tiene para crecer en ambientes muy diversos, información que permita la discriminación y determinación de la autenticidad de cultivares, e información sobre el potencial de esa especie como fuente de compuestos útiles para la salud humana y de los animales.

3. Objetivo

Determinar la variabilidad genética y química de 32 cultivares y tres formas silvestres de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) y de *P. coccineus* del estado de Durango, México, usando microsatélites e ISSR como marcadores moleculares y los perfiles fenólicos foliares como marcadores químicos.

4. Materiales y métodos

La Figura 2 muestra el desarrollo experimental y el tiempo necesario para los análisis moleculares y químicos

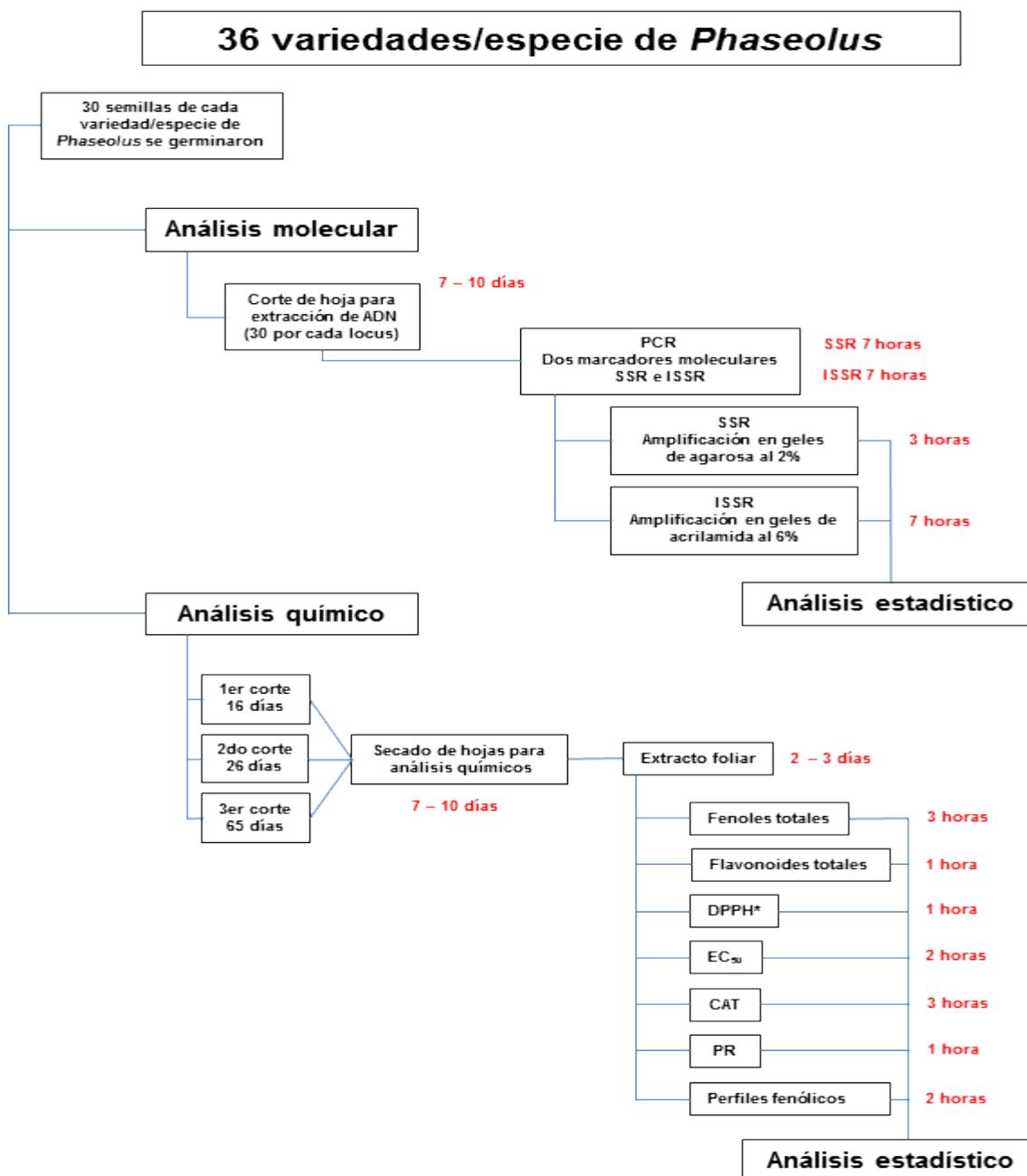


Fig.2 Desarrollo experimental y tiempos de análisis.

4.1 Material vegetal

Semillas de 29 variedades de frijol común fueron proporcionadas de la colección del Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria en el estado de Durango (INIFAP Dgo). Semillas de tres variedades fueron proporcionadas por el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (CIIDIR IPN Sinaloa); y semillas de tres formas silvestres fueron proporcionadas de una colección privada. Con fines comparativos, semillas y plántulas de *Phaseolus coccineus* se trataron y analizaron de la misma manera. Los nombres de las variedades y su procedencia se presentan en la Tabla 1. Las semillas de cada variedad fueron germinadas en mayo de 2012, en camas de germinación a temperatura ambiente, con un fotoperiodo de 13 horas de luz y 11 horas de oscuridad; las camas de germinación fueron regadas cada 48 horas para mantener el sustrato húmedo, el sustrato estuvo formado por una mezcla de turba y tierra para jardín (Vigoro®), en una proporción 1:3.

Tabla 1. Cultivares de *Phaseolus vulgaris* analizados en el presente estudio.

Número de Referencia	Muestra	Procedencia
1	Negro Zacatecas	INIFAP – Dgo
2	Negro San Luis	INIFAP – Dgo
3	Negro Altiplano	INIFAP – Dgo
4	Negro Vizcaya	INIFAP – Dgo
5	Negro V – 8025	INIFAP – Dgo
6	Negro Friozac 101	INIFAP – Dgo
7	Pinto Mestizo	INIFAP – Dgo
8	Pinto Saltillo	INIFAP – Dgo
9	Canario Regional	INIFAP – Dgo
10	Azufrado Namiquipa	INIFAP – Dgo
11	Azufrado Higuera	INIFAP – Dgo
12	Flor de Mayo M-38	INIFAP – Dgo
13	Azufrado Pimono 78	INIFAP – Dgo
14	Río Grande Querétaro	INIFAP – Dgo
15	Pinto Libertad	INIFAP – Dgo
16	Vaquita	INIFAP – Dgo
17	Pinto Bravo	INIFAP – Dgo
18	Pinto Centenario	INIFAP – Dgo
19	Pinto Coloso	INIFAP – Dgo
20	Pinto Durango	INIFAP – Dgo
21	Pinto Bayacora	INIFAP – Dgo
22	Pinto Villa	INIFAP – Dgo

23	Flor de Mayo Sol	INIFAP – Dgo
24	Flor de Junio Ana	INIFAP – Dgo
25	Flor de Junio Marcela	INIFAP – Dgo
26	Bayo Madero	INIFAP – Dgo
27	Bayo Victoria	INIFAP – Dgo
28	F. M. 2000	INIFAP – Dgo
29	Pinto Centauro	INIFAP – Dgo
30	Negro Plus (Sinaloa)	IPN – CIIDIR Sinaloa
31	Pinto Saltillo (Sinaloa)	IPN – CIIDIR Sinaloa
32	Azufrado Higuera (Sinaloa)	IPN – CIIDIR Sinaloa
33	Patol (<i>Phaseolus coccineus</i>)	Vicente Guerrero, Dgo.
34	Silvestre Negro	Barranca del Cordón de Bueyes, Guanaceví, Dgo.
35	Silvestre Café	Barranca del Cordón de Bueyes, Guanaceví, Dgo.
36	Silvestre Amarillo	Barranca del Cordón de Bueyes, Guanaceví, Dgo.

4.2 Caracterización morfológica

Las características que se evaluaron fueron el peso de cien semillas (PCS) expresado en gramos, de acuerdo a Vidal-Barahona *et al.* (2006); largo de semilla (LS) expresado en centímetros; ancho de semilla (AS) expresado en centímetros; y grosor de semilla (GS) expresado en centímetros. Las estimaciones de esas tres dimensiones se realizaron con un vernier.

4.3 Análisis molecular

4.3.1 Modificación del protocolo de extracción de ADN de Coelho *et al.* (2009)

El ADN total de 30 plántulas de entre 7 y 10 días de edad se extrajo y se analizó de manera individual a partir de tejido foliar (100 mg) pulverizado con nitrógeno líquido. Los tejidos pulverizados se combinaron con 800 µL de regulador de extracción, conteniendo CTAB al 2%, NaCl 1.4 M, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 20 mM, 2-mercaptoetanol al 2% y polivinilpirrolidona (PVP peso molecular 40 000) al 3%. Una diferencia con el protocolo original de Coelho *et al.* (2009) es que esos autores adicionan 36 mg de PVP a los tejidos después de la adición de nitrógeno líquido y no como parte del regulador de extracción. Las muestras se incubaron a 65°C durante 60 minutos, después se combinaron con 600 µL de cloroformo, se

agitaron y se centrifugaron (10 000 rpm durante 10 minutos) a temperatura ambiente. El sobrenadante, fase acuosa conteniendo el ADN disuelto, se recuperó y se le adicionó cloroformo en proporción 1:1, después de agitar suavemente la mezcla se centrifugó bajo las condiciones descritas. La fase acuosa resultante se recuperó y se combinó con 500 μ L de isopropanol frío y se incubaron durante 30 min a -20°C para precipitar el ADN antes de centrifugarse (10 000 rpm durante 10 minutos). Se descartó el sobrenadante y la pastilla conteniendo el ADN se resuspendió en 300 μ L de TE (Tris 10mM, EDTA 1mM) y 150 μ L de NaCl 5M, después se adicionaron 900 μ L de etanol absoluto frío, las muestras se incubaron a -20°C durante 30 minutos, se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó dos veces con 500 μ L de etanol al 75%. Este lavado con etanol es adicional al protocolo original de Coelho *et al.* (2009). Después de centrifugar a las condiciones ya señaladas, el sobrenadante se descartó, la pastilla de ADN se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 μ L de TE.

4.3.2 Modificación del protocolo de extracción de ADN de Keb-LLanes *et al.* (2002)

El ADN total de 30 plántulas de entre 7 y 10 días de edad se extractó y se analizó de manera individual a partir de tejido foliar (100 mg) pulverizado con nitrógeno líquido. Los tejidos pulverizados se combinaron con 300 μ L de regulador de extracción A el cual contiene CTAB al 2%, Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, EDTA 20 mM, NaCl 1.4M, polivinilpirrolidona (PVP peso molecular 40 000) al 4%, ácido ascórbico al 0.1%, 2-mercaptoetanol 10mM; y con 900 μ L del regulador de extracción B (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, EDTA 50 mM, NaCl 100 mM, 2-mercaptoetanol 10mM; y 100 μ L de SDS al 20%. Las muestras se incubaron a 65°C durante 30 minutos, después se combinaron con 410 μ L de acetato de potasio 5M frío, y se centrifugaron (8 000 rpm durante 15 minutos) a temperatura ambiente. El sobrenadante se recuperó y se le adicionó cloroformo en proporción 1:1, se centrifugó bajo las condiciones ya señaladas y se se recuperó la fase

acuosa. La adición de cloroformo es una modificación al protocolo original de Keb-Llanes *et al.* (2002). La fase acuosa se combinó con 800 μL de isopropanol frío y se incubó -20°C durante 30 min para precipitar el ADN. Las muestras se centrifugaron a 8 000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante, y la pastilla conteniendo el ADN se resuspendió en 800 μL de TE (Tris 10mM, EDTA 1mM), 70 μL de acetato de sodio 3M (pH 5.2), y 500 μL de isopropanol (-20°C), se incubó durante 60 minutos a -20°C . Las muestras se centrifugaron a 8 000 rpm durante 10 minutos, la pastilla se lavó con 1 mL de etanol al 70%, y se dejó secar a temperatura ambiente antes de que se resuspendiera en 50 μL de TE.

4.3.3 Cuantificación del ADN obtenido

La determinación de la cantidad de ADN obtenido se realizó de manera espectrofotométrica. Se tomaron 4 μL de cada solución individual de ADN y se combinaron con 996 μL de agua inyectable (dilución 1/250). Se determinaron los valores de absorbancia a 260 nm (A_{260}). La concentración de ADN en cada muestra se estimó considerando que una solución de ADN de concentración igual a 50 ng/ μL tiene un valor de A_{260} de 1 (Chan, 1992).

4.3.4 Pureza del ADN obtenido

La determinación de la pureza de las soluciones de ADN se realizó de manera espectrofotométrica de acuerdo a Sambrook *et al.* (1989). De manera individual se registraron los valores de A_{280} y se calcularon los valores de la relación A_{260}/A_{280} , considerando las lecturas previas de A_{260} . Valores de esas proporciones iguales o mayores de 1.7 indicaron que el ADN se encontraba lo suficientemente libre de proteínas para poder ser amplificado por PCR.

4.3.5 Apreciación del tamaño molecular y de la integridad del ADN obtenido

La apreciación del tamaño molecular y de la integridad de las muestras de ADN se realizó por electroforesis en geles de agarosa de acuerdo a Andrews (1994). Se prepararon geles de agarosa al 0.8%, utilizando el regulador TAE (Tris-HCl 0.4 M, EDTA 2 M, ácido acético el necesario para ajustar el pH a 8). La electroforesis se desarrolló a 70 volts. Los geles se tiñeron con Sybr Green.

4.3.6 Amplificación de SSR por PCR

La amplificación de loci de microsatélites se realizó de acuerdo al método modificado de Svetleva *et al.* (2006) con los pares de iniciadores BM210 (5' – ACC ACT GCA ATC CTC ATC TTT G – 3')/AF483902 (5' – CCC TCA TCC TCC ATT CTT ATC G – 3'), BM53 (5' – AAC TAA CCT CAT ACG ACA TGA AA – 3')/AF483849 (5' – AAT GCT TGC ACT AGG GAG TT – 3') y GATS91 (5' – GAG TGC GGA AGC GAG TAG AG – 3')/AF483842 (5' – TCC GTG TTC CTC TGT CTG TG – 3'). Para cada muestra individual se preparó una mezcla de reacción conteniendo iniciadores, cada uno a una concentración de 10 µM; 4 µL de regulador 1X de Green GoTaq Flexi Buffer (Promega); MgCl₂ 1.5 mM; mezcla de nucleótidos 0.2 mM; GoTaq DNA polimerasa (Promega) 1U; ADN molde 25 nM; y agua para ajustar el volumen de reacción a 20 µl. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante cuatro minutos; 40 ciclos, comprendiendo un paso de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, uno de alineación a 46°C durante 45 segundos, y uno de extensión a 72°C durante dos minutos; finalizando con 7 minutos a 72°C. Los loci amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%, sometidos a un voltaje constante de 70 Volts.

4.3.7 Amplificación de ISSR por PCR

La amplificación de loci de ISSR se realizó de acuerdo al método de Sanguinetti *et al.* (1994) con los iniciadores 899 (5' – CAC ACA CAC ACA RG – 3') y 814 (5' –

CTC TCT CTC TCT CTC TTG – 3'). Para cada muestra individual se preparó una mezcla de reacción, en un volumen total de 20 μ L, conteniendo 4 μ L de buffer de reacción 5x; 2 μ L de $MgCl_2$ (25 mM); 1.6 μ L de cada iniciador (10 pm/ μ L); 0.5 μ L de mezcla de nucleótidos (10 mM); 0.2 μ L de GoTaq DNA polimerasa (Promega, 5U); 1 μ L de una solución de ADN (100 ng/ μ L); y agua para ajustar el volumen de reacción a 20 μ L. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante tres minutos; 40 ciclos, comprendiendo un paso de desnaturalización a 95°C durante 45 segundos, uno de alineación a 52°C durante 45 segundos, y uno de extensión a 72°C durante un minuto y medio; finalizando con 10 minutos a 72°C. Los loci amplificados se separaron por electroforesis en geles de acrilamida al 6%, sometidos a un voltaje constante de 200 Volts durante cinco horas.

4.4 Análisis químico

4.4.1 Preparación de los extractos fenólicos foliares

Se colectaron hojas de 30 plantúlas de cada cultivar a los 16, 26 y 65 días. Las hojas de cada edad se analizaron de manera independiente. Las hojas de las 30 plántulas de una muestra se mezclaron y se formaron tres submuestras, las cuales se analizaron de manera independiente. Las hojas se secaron en un secador botánico a 40°C hasta llevarlas a peso peso constante; se molieron en una licuadora doméstica y se almacenaron en bolsas de papel, en oscuridad y a temperatura ambiente hasta realizar las determinaciones de fenoles totales, flavonoides totales, y las pruebas de antioxidancia.

Un gramo de tejido foliar seco y molido de cada muestra se maceró en 20 mL de etanol 50% (v/v), durante 24 horas, en oscuridad y a temperatura ambiente; los extractos fueron centrifugados a 8 000 rpm por cinco minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante fue separado. La pastilla fue reextractada en 20 mL de etanol al 50% (v/v) por una hora y se centrifugó bajo las mismas condiciones.

Ambos sobrenadantes de una misma muestra se combinaron y formaron el extracto total; una alícuota de 10 mL fue separada para realizar los análisis de fenoles y flavonoides totales. El extracto restante, fue concentrado a la mitad del volumen y entonces se fraccionó dos veces con 10 mL de acetato de etilo. La fracción orgánica (acetato de etilo) se concentró a sequedad y se resuspendió en 3 mL de metanol; alícuotas de 100 μ L fueron tomadas para ser usadas en el análisis de HPLC/DAD, el cual se describirá más adelante.

4.4.2 Determinación de fenoles totales

La concentración de los fenoles totales de las muestras de tejido foliar para cada muestra, fue determinada usando el reactivo de Folin-Ciocalteu, de acuerdo con el método de Falleh *et al.* (2011). Se tomaron 250 μ L ml de cada muestra, se le agregaron 125 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu y se le agregaron 2500 μ L de agua destilada, la mezcla fue agitada por un tiempo de dos minutos y después se le agregaron 375 μ L de Na_2CO_3 al 20%, dando un volumen final de 3250 μ L. Se incubaron en la oscuridad por un tiempo de 90 minutos; el blanco se preparó con 250 μ L de metanol [MeOH] y se le dio el mismo tratamiento que a cada muestra. Se registraron los valores de absorbancia de las muestras a 760 nm. El contenido de fenoles fue expresado como mg equivalentes de ácido gálico/g de peso seco (mg EAG/g ps), usando una curva de calibración de ácido gálico ($\text{Abs}_{760\text{nm}} = 0.0317 [\text{ácido gálico}] + 0.0231$, coeficiente de correlación $r = 0.9906$), elaborada con cuatro concentraciones de este compuesto entre 0.025 y 6.5 mg/mL. Se analizaron tres muestras independientes de cada variedad.

4.4.3 Determinación de flavonoides totales

El contenido de flavonoides fue determinado por un análisis de regresión lineal usando una curva estándar de quercetina: $\text{Abs}_{425\text{nm}} = 0.119 [\text{Quercetina}] - 0.0414$, coeficiente de correlación $r = 0.9995$, esta curva fue elaborada después de agregarle cloruro de aluminio a cada una de las cuatro alícuotas de diferentes concentraciones (100 a 1400 μ g/mL vs. Absorbancia); los valores de absorbancia

fueron registrados a 425 nm (Lauranson–Broyer y Lebreton, 1993). El contenido de los flavonoides en cada muestra fue registrado después de la adición del cloruro de aluminio y expresada como mg equivalentes de quercetina/g de peso seco (mg EQ/g ps). Se analizaron tres muestras independientes de cada variedad.

4.4.4 Análisis HPLC-DAD

La composición de fenoles en las hojas se determinó por HPLC (Perkin Elmer Series 200), usando el método en gradiente descrito por Campos y Markham, (2007), en el cual se utiliza acetonitrilo y agua acidificada con ácido fosfórico como fase móvil. Se utilizó una columna Perkin Elmer Brownlee Analytical C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm). El volumen de inyección fue de 50 µL. Los cromatogramas se registraron a 260 y 340 nm. Los espectros UV se obtuvieron en el intervalo de 200 a 400 nm, usando un detector de arreglo de diodos (Perkin Elmer Series 200). La información estructural para cada compuesto resuelto en los cromatogramas se obtuvo por comparación directa de los tiempos de retención y sus espectros UV con los de estándares, y de acuerdo a la información de espectros UV compilados por Mabry *et al.* (1970) y Campos y Markham (2007).

4.5 Actividad antioxidante

4.5.1 Bloqueo del radical libre DPPH*

El método de DPPH* reportado por Campos (1997) fue usado para evaluar la capacidad antioxidante. Cuatro a cinco concentraciones de flavonoides de cada muestra (10 a 400 µL; las concentraciones respectivas de flavonoides se calcularon a partir de la siguiente curva estándar de Quercetina: $Abs_{425nm} = 0.119 [Quercetina] - 0.0414$, coeficiente de correlación $r = 0.9995$) se adicionaron de manera individual a una solución de DPPH* (40 µg/mL en etanol), el volumen final se mantuvo en 1 mL. El decremento en los valores de absorbancia fue determinada a 523 nm después de 30 minutos. La concentración de DPPH* en el

medio de reacción contra la concentración de flavonol de las muestras se graficó para determinar por regresión lineal la concentración eficiente al 50%, definida como la cantidad de flavonoides en cada extracto necesaria para disminuir en un 50% la concentración inicial de DPPH* (EC₅₀). Una curva de calibración construida con concentraciones de DPPH* entre 6.25 y 100 µg/mL ($A_{523} = 0.0233 [\text{DPPH}^*] - 0.0174$, coeficiente de correlación $r = 0.9909$) se utilizó para estimar las concentraciones de DPPH* en el medio de reacción después de la adición de concentraciones incrementadas de antioxidante. La actividad bloqueadora de radicales libres se expresó en términos de EC₅₀ en µg/mL. Se analizaron tres muestras independientes de cada muestra. La quercetina, quercitrina y ácido cafeíco fueron usados como referencia y se analizaron de la misma manera.

4.5.2 Capacidad antioxidante total (TAC)

La TAC de cada extracto fue evaluado por el método reportado por Prieto *et al.* (1999). En este método se evalúa la reducción del Mo (VI) a Mo (V) llevada a cabo por un antioxidante, con lo que se forma, en medio ácido, un complejo entre el fosfato y Mo (V), el cual es de color verde. Se prepararon alícuotas de 100 µL de cada muestra (conteniendo 100 µg/mL de flavonoles) combinadas con 1 mL de una solución que contenía ácido sulfúrico (0.6 M), fosfato de sodio (28 mM) y molibdato de amonio (4 mM). Las mezclas se incubaron a 95°C por un tiempo de 90 minutos; después se enfriaron a temperatura ambiente, la absorbancia de las muestras fue registrada a 695 nm contra un blanco preparado como las muestras, al cual se agregó etanol en lugar de muestra. Se utilizó la quercitrina como referencia y fue analizada de la misma manera. La capacidad antioxidante total fue expresada como mg equivalentes de ácido ascórbico/mL (mg EAA/mL), los cuales se calcularon a partir de una curva de calibración ($A_{695} = 0.1519 + 0.063 [\text{ácido Ascórbico}]$, coeficiente de correlación $r = 0.991$) construida con ácido ascórbico entre 1.0 y 30 µg/mL. Se analizaron tres muestras independientes de cada muestra.

4.5.3 Poder reductor de hierro (PR)

El RP para extractos foliares fue evaluada de acuerdo a Yang *et al.* (2008). Alícuotas de 1 mL de cada muestra se combinaron con 2.5 mL de bufer fosfato (0.2 M, pH 6.6) y 2.5 mL de ferrocianuro de potasio (30 mM) y se incubaron a 50°C por 20 minutos. Entonces se le agregaron 2.5 mL de ácido tricloroacético (0.6 M) y la mezcla se centrifugó a 3 000 rpm por 10 minutos. Del sobrenadante se tomaron 2.5 mL y se le adicionaron 2.5 mL de agua destilada y 0.5 mL de cloruro férrico (6 mM). Después de 10 minutos se forman iones fierro (Fe^{+2}) y se leen a una absorbancia de 700 nm. Los valores más altos de absorbancia indican la capacidad más alta de reducción de iones Fe^{+3} a iones Fe^{+2} . Como referencias se analizaron de la misma manera quercetina, quercitrina y ácido ascórbico. El análisis se llevó a cabo para tres alícuotas independientes para cada muestra.

4.6 Análisis de datos

Los resultados del análisis morfológico se sometieron a un ANOVA simple y a un análisis de discriminación de medias (LSD), usando el programa SPSS statistics 17.0. Los datos morfológicos también se sometieron a un análisis de agrupamiento, previa construcción de una matriz que contenía los parámetros evaluados, usando el programa PAST v.2.18 (Hammer *et al.*, 2001).

Con los datos moleculares se construyeron matrices binarias de presencia (1)-ausencia (0), que se analizaron con el programa Popgene v.1.32 (Yeh *et al.*, 1999) para calcular el porcentaje de loci polimórficos, índice Shannon (H), número de alelos observados (n_a^*) y número de alelos esperados (n_e^*). Los marcadores moleculares se caracterizaron de acuerdo a el número de bandas polimórficas, número de bandas totales, proporción de loci polimórficos, contenido de información polimórfica (PIC), utilizando el software InfoGen v.2013 (Balzarini y Di Rienzo 2004). Análisis de agrupamiento basados en los datos moleculares se realizaron con el programa PAST v.2.18 (Hammer *et al.*, 2001).

Los datos de fenoles y flavonoides totales, y de capacidad antioxidante se sometieron a un ANOVA simple y a un análisis de discriminación de medias (LSD). Con los perfiles fenólicos se construyó una matriz binaria de presencia (1)-ausencia (0) que se sometió a un análisis de agrupamiento, usando el programa PAST v.2.18 (Hammer *et al.*, 2001).

5. Resultados y discusión

5.1 Características morfológicas

Las semillas de las variedades evaluadas son lisas y de diferentes colores, en la Tabla 2 se muestran los pesos de las semillas de 35 cultivares de frijol común (32 cultivadas y 3 silvestres) y de las semillas de *Phaseolus coccineus*.

Tabla 2. Peso promedio de 100 semillas de 35 variedades de frijol común y de *Phaseolus coccineus*.

Número de muestra	Muestra	Peso/100 semillas (g)
33	<i>Phaseolus coccineus</i>	85.2 ± 0.300 a
32	Azufrado Higuera Sinaloa	48.1 ± 0.200 b
27	Bayo Victoria	43.5 ± 0.100 c
13	Azufrado Pimono 78	43.5 ± 0.400 c
7	Pinto Mestizo	43.3 ± 0.300 c
15	Pinto Libertad	43.0 ± 0.100 c
11	Azufrado Higuera	40.9 ± 0.300 d
18	Pinto Centenario	40.3 ± 0.200 de
26	Bayo Madero	39.9 ± 0.200 ef
17	Pinto Bravo	39.6 ± 0.300 f
19	Pinto Coloso	39.6 ± 0.200 f
22	Pinto Villa	36.4 ± 0.300 g
20	Pinto Durango	35.5 ± 0.200 h
10	Azufrado Namiquipa	34.5 ± 0.300 i
29	Pinto Centauro	33.7 ± 0.100 j
24	Flor De Junio Ana	33.4 ± 0.200 j
21	Pinto Bayacora	33.2 ± 0.200 jk
8	Pinto Saltillo	32.6 ± 0.200 kl
4	Negro Vizcaya	32.3 ± 0.300 lm
31	Pinto Saltillo Sinaloa	31.9 ± 0.100 mn

25	Flor De Junio Marcela	31.8 ± 0.200 mno
9	Canario Regional	31.3 ± 0.300 nop
16	Vaquita	31.3 ± 0.300 op
2	Negro San Luis	31.0 ± 0.700 p
12	Flor De Mayo M-38	30.7 ± 0.200 p
14	Río Grande Querétaro	27.6 ± 0.300 q
3	Negro Altiplano	27.4 ± 0.400 q
1	Negro Zacatecas	26.6 ± 0.900 r
23	Flor De Mayo Sol	25.3 ± 0.300 s
28	F.M.2000	24.4 ± 0.200 t
6	Negro Frijozac 101	24.2 ± 0.300 t
30	Negro Plus Sinaloa	21.6 ± 0.100 u
5	Negro V.8025	21.1 ± 0.300 u
36	Silvestre Amarillo	11.3 ± 0.500 v
35	Silvestre Café	10.8 ± 0.200 vw
34	Silvestre Negro	10.5 ± 0.200 w

Los valores representan la media y la desviación estándar para 100 semillas.

Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Los pesos variaron de 85.2 g, para *Phaseolus coccineus* (muestra 33) a 10.5 g para la variedad Silvestre Negro (muestra 34), encontrándose diferencias significativas interespecificas e intervarietales ($p < 0.05$).

Los pesos de las semillas de las variedades de frijol común analizadas caen en el intervalo de pesos reportado por Rosales Serna *et al.* (2004) y se pueden ubicar en la clasificación que esos mismos autores proponen, a saber: a) Pequeño, cuando la muestra de 100 semillas pesa menos de 25 g ($m < 25$ g); b) Mediano, cuando su peso está entre 25 y 40 g ($25 < m < 40$ g); y c) Grande, cuando su peso es mayor de 40 g ($m > 40$ g).

Con respecto al largo de la semilla, los mayores registros se encontraron para *Phaseolus coccineus* (1.725 cm), y los menores para Silvestre Amarillo (muestra 36) 0.525 cm (Tabla 3). Las diferencias en el largo de las semillas fueron significativas entre las dos especies y entre algunas variedades de frijol común ($p < 0.05$).

Tabla 3. Largo promedio de la semillas de 35 variedades de frijol común y de *Phaseolus coccineus*.

Número de muestra	Muestra	Largo (cm)
33	<i>Phaseolus coccineus</i>	1.725 ± 0.123 a
15	Pinto Libertad	1.543 ± 0.125 b
7	Pinto Mestizo	1.429 ± 0.063 bc
27	Bayo Victoria	1.405 ± 0.083 bc
17	Pinto Bravo	1.384 ± 0.110 bcd
18	Pinto Centenario	1.374 ± 0.146 cd
13	Azufrado Pimono 78	1.372 ± 0.064 cd
22	Pinto Villa	1.369 ± 0.061 cd
19	Pinto Coloso	1.341 ± 0.099 cde
11	Azufrado Higuera	1.302 ± 0.117 cdef
29	Pinto Centauro	1.290 ± 0.126 cdefg
26	Bayo Madero	1.242 ± 0.062 defgh
12	Flor De Mayo M-38	1.232 ± 0.094 defgh
8	Pinto Saltillo	1.227 ± 0.073 defghi
32	Azufrado Higuera Sinaloa	1.226 ± 0.098 defghi
21	Pinto Bayacora	1.226 ± 0.066 defghi
10	Azufrado Namiquipa	1.191 ± 0.086 efghi
20	Pinto Durango	1.163 ± 0.039 fghij
28	F.M.2000	1.159 ± 0.040 fghij
31	Pinto Saltillo Sinaloa	1.150 ± 0.073 fghij
3	Negro Altiplano	1.149 ± 0.073 fghij
4	Negro Vizcaya	1.141 ± 0.054 ghij
9	Canario Regional	1.117 ± 0.075 hijk
16	Vaquita	1.114 ± 0.052 hijk
25	Flor De Junio Marcela	1.101 ± 0.079 hijk
1	Negro Zacatecas	1.101 ± 0.258 hijk
6	Negro Friozac 101	1.100 ± 0.047 hijk
24	Flor De Junio Ana	1.091 ± 0.044 hijkl
2	Negro San Luis	1.067 ± 0.092 ijkl
5	Negro V.8025	1.021 ± 0.036 jkl
30	Negro Plus Sinaloa	0.973 ± 0.051 kl
14	Río Grande Querétaro	0.973 ± 0.057 kl
23	Flor De Mayo Sol	0.939 ± 0.069 l
34	Silvestre Negro	0.570 ± 0.066 m
35	Silvestre Café	0.560 ± 0.052 m
36	Silvestre Amarillo	0.525 ± 0.039 m

Los valores representan la media y la desviación estándar para 100 semillas.
Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Los registros obtenidos para el grosor de la semilla se muestran en la Tabla 4, siendo el Azufrado Pimono 78 (muestra 13) el de mayor ancho con 0.643 cm y el Silvestre Amarillo (muestra 36) el de menor ancho con 0.271 cm. Las diferencias encontradas fueron significativas entre las dos especies de *Phaseolus* y entre algunas de las variedades de frijol común.

Tabla 4. Grosor promedio de las semillas de 35 variedades de frijol común y de *Phaseolus coccineus*.

Número de muestra	Muestra	Grosor (cm)
13	Azufrado Pimono 78	0.643 ± 0.029 a
7	Pinto Mestizo	0.635 ± 0.190 ab
26	Bayo Madero	0.625 ± 0.053 ab
9	Canario Regional	0.624 ± 0.085 ab
27	Bayo Victoria	0.621 ± 0.048 ab
32	Az Higuera Sinaloa	0.593 ± 0.035 abc
33	<i>Phaseolus coccineus</i>	0.583 ± 0.090 abcd
10	Azufrado Namiquipa	0.567 ± 0.279 abcde
16	Vaquita	0.565 ± 0.037 abcde
15	Pinto Libertad	0.560 ± 0.041 abcde
22	Pinto Villa	0.555 ± 0.047 abcde
6	Negro Frijozac 101	0.545 ± 0.031 abcdef
21	Pinto Bayacora	0.540 ± 0.038 abcdefg
28	F.M.2000	0.539 ± 0.033 abcdefg
24	Flor De Junio Ana	0.526 ± 0.061 abcdefg
1	Negro Zacatecas	0.519 ± 0.072 abcdefg
11	Azufrado Higuera	0.517 ± 0.042 abcdefg
25	Flor De Junio Marcela	0.516 ± 0.035 abcdefg
2	Negro San Luis	0.516 ± 0.044 abcdefg
17	Pinto Bravo	0.513 ± 0.069 abcdefg
3	Negro Altiplano	0.512 ± 0.050 abcdefg
4	Negro Vizcaya	0.507 ± 0.034 bcdefg
18	Pinto Centenario	0.485 ± 0.036 cdefg
12	Flor De Mayo M-38	0.466 ± 0.057 cdefgh
19	Pinto Coloso	0.464 ± 0.051 cdefgh
5	Negro V.8025	0.462 ± 0.042 cdefgh
14	Río Grande Querétaro	0.459 ± 0.032 defgh
30	Negro Plus Sinaloa	0.449 ± 0.040 efgh
8	Pinto Saltillo	0.448 ± 0.045 efgh
23	Flor De Mayo Sol	0.442 ± 0.026 efghi
20	Pinto Durango	0.442 ± 0.054 efghi
31	Pinto Saltillo Sinaloa	0.419 ± 0.025 fgghi
29	Pinto Centauro	0.413 ± 0.062 ghi
34	Silvestre Negro	0.350 ± 0.039 hij
35	Silvestre Café	0.313 ± 0.032 ij
36	Silvestre Amarillo	0.271 ± 0.035 j

Los valores representan la media y la desviación estándar para 100 semillas.
Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

En cuanto al ancho de la semilla, la Tabla 5 muestra los valores registrados, siendo el de mayor valor el de *Phaseolus coccineus*, con 1.050 cm y el de menor valor registrado el del Silvestre Amarillo (muestra 36) con 0.321 cm. Las

diferencias encontradas fueron significativas entre las dos especies de *Phaseolus* y entre algunas de las variedades de frijol común ($p < 0.05$).

Tabla 5. Ancho promedio de las semillas de 35 variedades de frijol común y de *Phaseolus coccineus*.

Número de muestra	Muestra	Ancho (cm)
33	<i>Phaseolus coccineus</i>	1.050 ± 0.079 a
27	Bayo Victoria	0.925 ± 0.042 b
15	Pinto Libertad	0.873 ± 0.053 bc
26	Bayo Madero	0.852 ± 0.043 bcd
16	Vaquita	0.830 ± 0.027 cde
7	Pinto Mestizo	0.798 ± 0.046 def
21	Pinto Bayacora	0.790 ± 0.047 def
22	Pinto Villa	0.783 ± 0.024 def
20	Pinto Durango	0.782 ± 0.022 def
13	Azufrado Pimono 78	0.769 ± 0.043 efg
9	Canario Regional	0.756 ± 0.035 fgh
6	Negro Frijozac 101	0.742 ± 0.043 fghi
18	Pinto Centenario	0.740 ± 0.051 fghij
24	Flor De Junio Ana	0.737 ± 0.024 fghijk
10	Azufrado Namiquipa	0.728 ± 0.059 fghijkl
3	Negro Altiplano	0.727 ± 0.024 fghijkl
12	Flor De Mayo M-38	0.703 ± 0.033 ghijklm
5	Negro V.8025	0.700 ± 0.026 ghijklm
25	Flor De Junio Marcela	0.698 ± 0.028 ghijklm
32	Azufrado Higuera Sinaloa	0.693 ± 0.037 hijklm
1	Negro Zacatecas	0.691 ± 0.052 hijklm
2	Negro San Luis	0.689 ± 0.033 hijklm
4	Negro Vizcaya	0.686 ± 0.034 hijklm
19	Pinto Coloso	0.683 ± 0.076 hijklm
17	Pinto Bravo	0.682 ± 0.041 ijklm
28	F.M.2000	0.680 ± 0.024 ijklmn
30	Negro Plus Sinaloa	0.667 ± 0.037 jklmn
8	Pinto Saltillo	0.666 ± 0.047 klmn
11	Azufrado Higuera	0.658 ± 0.042 lmn
29	Pinto Centauro	0.655 ± 0.043 lmn
14	Río Grande Querétaro	0.644 ± 0.026 mn
31	Pinto Saltillo Sinaloa	0.608 ± 0.040 no
23	Flor De Mayo Sol	0.567 ± 0.014 o
35	Silvestre Café	0.443 ± 0.051 p
34	Silvestre Negro	0.422 ± 0.033 p
36	Silvestre Amarillo	0.321 ± 0.025 q

Los valores representan la media y la desviación estándar para 100 semillas.
Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

La Figura 3 muestra el dendrograma resultado de un análisis de cluster, considerando las cuatro características físicas analizadas de las semillas (peso,

largo, ancho, y grosor), en él se observa que *Phaseolus coccineus* (muestra 33) forma un grupo independiente del resto de las semillas analizadas.

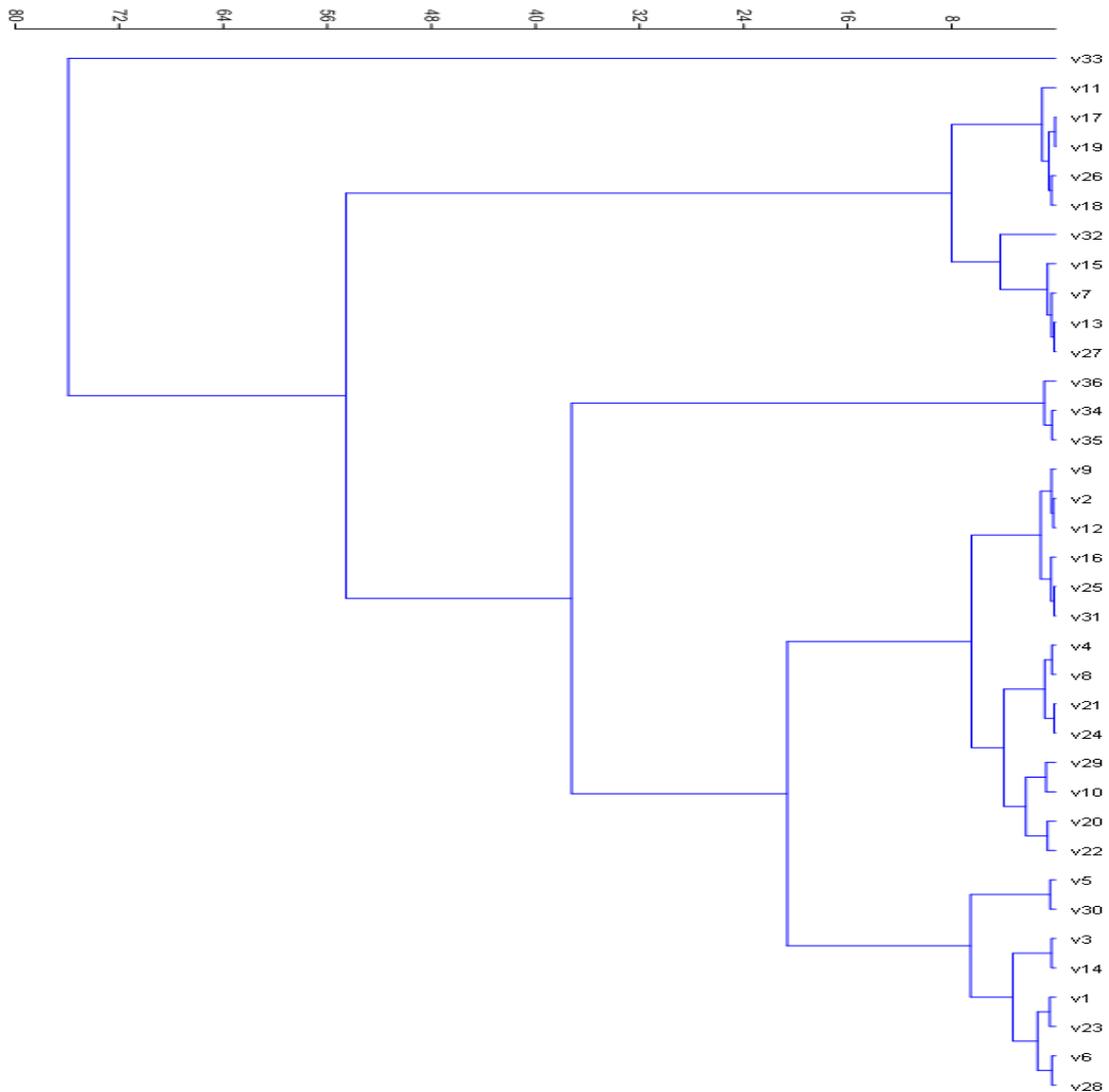


Fig. 3. Resultados de un análisis de agrupamiento comparando el peso, largo, ancho, y grosor de las semillas de *Phaseolus coccineus* y de 35 variedades de frijol común. Los números corresponden a los nombres de las muestras de la Tabla 1

García y Lasa (1991) hacen referencia a que las semillas mas pesadas son más vigorosas por tener más reservas endospermicas, pero pueden necesitar más agua, lo que sería un grave problema si se presentara un caso grave de sequía; sin embargo, ya que el vigor de las semillas tiene determinantes genéticos y

ambientales (Talai y Sen-Mandi, 2010), la relación peso-vigor es relativa. Las dimensiones de las semillas son en extremo variables y la respuesta a la evaluación del vigor depende de cada variedad; existen casos en los que no se ha detectado ningún tipo de correlación entre la emergencia y las dimensiones de las semillas (Hoy y Gamble, 1985; Johnson y Wax, 1978; Vanderlip *et al.*, 1973).

5.2 Análisis molecular

5.2.1 Extracción de ADN

Se probaron los métodos de Coelho *et al.* (2009) y Keb-Llanes *et al.* (2002) para la extracción de ADN, como ejemplo de los resultados obtenidos, en la Tabla 6 se muestran los valores de A_{260} , A_{260}/A_{280} , y la concentración de ADN aislado de la variedad Pinto Saltillo. En la Figura 4 se muestra el ADN obtenido con ambos métodos para esa misma variedad, se observa una migración electroforética baja, lo que indica un tamaño molecular alto y un bajo nivel de degradación, indicado por el fondo tenue a lo largo de los carriles. En esta misma Figura 3 se pueden observar cantidades menores de ADN que fue obtenido por el método de Keb-Llanes *et al.* (2002). Estos resultados indican que ambos métodos permitieron el aislamiento del ADN de alto peso molecular a partir de tejido foliar; sin embargo, el modificado de Coelho *et al.* (2009) permitió obtener mayor cantidad de material genético en mejor calidad.

Tabla 6. Valores de A_{260} , A_{260}/A_{280} , y concentración de ADN de 10 muestras de frijol de la variedad Pinto Saltillo obtenido por los métodos de Coelho *et al.* (2009) y Keb-Llanes *et al.* (2002)

Método modificado de Coelho <i>et al.</i> (2009)					Método modificado de Keb-Llanes <i>et al.</i> (2002)				
Muestra	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{260nm}/A_{280nm}	Concentración (ng/ μ L)	Muestra	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{260nm}/A_{280nm}	Concentración (ng/ μ L)
1	0.505	0.282	1.79	6308.33	1	0.019	0.021	0.90	237.50
2	0.302	0.181	1.67	3770.83	2	0.028	0.028	1.00	354.17
3	0.622	0.336	1.85	7770.83	3	0.022	0.02	1.10	275.00
4	0.354	0.204	1.74	4429.17	4	0.030	0.025	1.20	370.83
5	0.152	0.105	1.45	1895.83	5	0.049	0.041	1.19	608.33
6	0.219	0.126	1.74	2741.67	6	0.018	0.013	1.38	220.83
7	0.307	0.183	1.68	3833.33	7	0.024	0.023	1.04	300.00
8	0.095	0.060	1.58	1187.50	8	0.010	0.011	0.90	129.17
9	0.232	0.141	1.65	2904.17	9	0.016	0.015	1.06	195.83
10	0.410	0.243	1.69	5120.83	10	0.017	0.015	1.13	212.50
			1.68 ± 0.11	3996.24 ± 2005.27				1.09 ± 0.14	290.41 ± 135.57

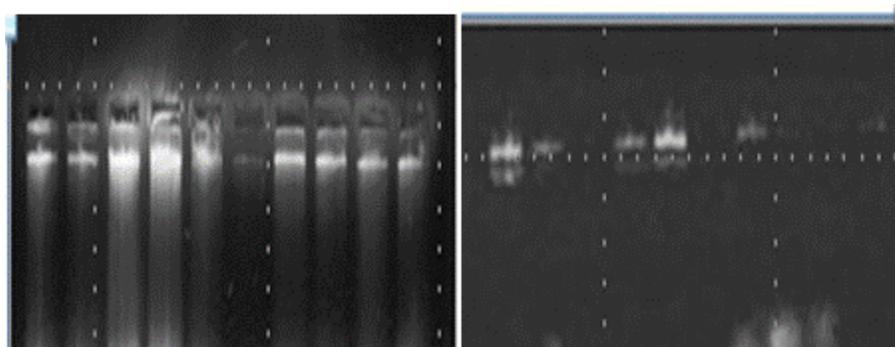


Fig 4. Gel de agarosa al 0.8% de muestras de ADN obtenidas a partir de tejido foliar de 10 individuos de frijol variedad Pinto Saltillo con el método modificado de Coelho *et al.* (2009) (izquierda) y de los mismos individuos con el método modificado de Keb-Llanes *et al.* (2002) (derecha). Se aprecia la baja migración y la relativamente baja degradación (fondo fluorescente tenue a lo largo de los carriles).

Los valores obtenidos para $A_{260\text{nm}}$ y $A_{280\text{nm}}$, $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, y la concentración de ADN para las 36 muestras analizadas con el protocolo modificado de Coelho *et al.* (2009) se presentan en el Anexo 1. Las estimaciones de pureza no siempre cumplieron con el criterio reportados por algunos autores (Schuler y Zielinsky, 1989; Sambrook *et al.*, 1989), que sugieren que $1.7 < A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} < 2.0$; sin embargo, en prácticamente todos los casos, las amplificaciones mediante PCR se pudieron llevar a cabo. Las concentraciones de ADN obtenido se encontraron en el intervalo de 25 a 18 575.00 ng/ μL (Anexo 1), y fueron suficientes para realizar la tipificación molecular de las muestras con microsatélites e ISSR, obteniendo con ambos marcadores perfiles de amplificación reproducibles y bien definidos.

5.2.2 Análisis de SSR

Las características de los pares de iniciadores microsatélites BM210/AF483902, BM53/AF483849 y GATS91/AF483842 se presentan en la Tabla 7, esos iniciadores amplificaron un total de 69 loci o alelos para las 35 variedades de frijol común y para *Phaseolus coccineus*, los tamaños de esos loci variaron de 61 a 976 pb. El par de iniciadores que más bandas amplificó fue el BM210/AF483902 (27 bandas) con un 15.12 % de amplificación a través de las 36 muestras. El número promedio de loci amplificados por iniciador fue de 23. El 100% de los loci amplificados por iniciador fue polimórfico.

El PIC estima el nivel de información de un marcador genético y estima la probabilidad de detectar polimorfismo por un iniciador o par de iniciadores entre dos genotipos, alcanza un valor máximo de 1 para marcadores codominantes (Sehgal et al., 2009), como lo son los microsatélites. El iniciador BM53 tuvo el valor más alto de PIC (0.25) (Tabla 7), lo que indica que fue ese iniciador el que detectó el número más alto de loci informativos, es decir, que contribuyen a la variación entre las muestras de *Phaseolus* analizadas.

Tabla 7. Resumen de la caracterización de los iniciadores de microsatélites BM53/AF483849, BM210/AF483902, y GATS91/AF483842, usados con 35 variedades de frijol común y de *Phaseolus coccineus*.

Primer	BP	BM	BT	PMF(95)	PIC	E.E.	AMP	PDICMA	na*	ne*	H
BM53/AF483849	23	0	23	0.96	0.25	0.01	21.01	4.40E-14	20.0000	7.9022	2.4049
BM210/AF483902	27	0	27	0.85	0.20	0.02	15.12	4.10E-12	21.0000	12.6469	2.7320
GATS91/AF483842	19	0	19	0.95	0.16	0.01	11.84	3.80E-09	15.0000	5.5796	2.0957
Total	69	0	69					6.90E-34			
Promedio							15.99		18.6667	8.7096	2.4109

BP: número de bandas polimórficas; BM: número de bandas monomórficas; BT: número de bandas totales; PMF(95), la proporción de loci polimórficos al 95%; PIC: el contenido de información polimórfica (PIC); EE: el error estándar del PIC; AMP: el porcentaje de amplificación (porcentaje de datos iguales a 1); PDICMA, la probabilidad de que dos individuos compartan un mismo alelo por azar; na*: número de alelos observados; ne*: número de alelos esperados; H: índice de Shannon.

Los valores de PIC encontrados en el presente trabajo caen entre los valores reportados por Cabral *et al.* (2011), quienes informan un intervalo de 0.11 a 0.51 para microsatélites en frijol común; por Benchimol *et al.* (2007), quienes encontraron un intervalo de 0.05 a 0.83 también para microsatélites en frijol común; y Sehgal *et al.* (2009), quienes detectaron valores entre 0.09 y 0.30 para microsatélites de *Carthamus tinctorius*. Tanto el número de loci amplificados como el tamaño de los mismos encontrados en el presente estudio fueron mayores que los reportados por Coehlo *et al.* (2009), quienes informaron sobre 25 loci amplificados con seis iniciadores de microsatélites en un intervalo de tamaño de 114 a 345 pb para 20 cultivares de frijol común de Portugal; el número de loci amplificados fue menor que el reportado por Khaidizar *et al.* (2012), quienes informaron sobre 72 loci amplificados con 30 iniciadores de microsatélites, entre

ellos dos (BM210 y GATS91) utilizados en el presente estudio, para 38 cultivares de frijol común de Turquía.

El índice de Shannon (H) es una medida de la diversidad genética; de acuerdo a Baev y Penev (1995), Magurran (1988) y Peet (1974) su valor indica el nivel de incertidumbre al considerar que un individuo tomado al azar pertenece a un grupo particular. El índice de Shannon frecuentemente toma valores entre 1.5 y 3.5, entre más alto sea el valor mayor diversidad; considerando que para que se alcancen valores de $H=3$ se necesita incluir 100 muestras como mínimo (Magurran, 1988). Considerando lo anterior, los tres iniciadores de SSR registraron valores relativamente bajos de H en la mayoría de las muestras de *Phaseolus* (Tabla 7).

Las Tablas 8, 9 y 10 muestran los loci amplificados con los pares de iniciadores BM53/AF483849, BM210/AF483902, y GATS91/AF483842 en cada una de las 36 muestras de *Phaseolus*. Los resultados de un análisis de agrupación basado en los perfiles de amplificación con el par de iniciadores BM53/AF483849 indican la formación de dos grupos principales, cuyos elementos dentro de cada grupo tienen una mayor relación genética que con los miembros del otro grupo. El grupo 1 estuvo formado por todas las variedades de color negro, las tres formas silvestres, las dos variedades de bayo analizadas, y por dos variedades de pintos. El grupo 2 incluyó a todas las variedades cultivadas amarillas y café claro, las Flor de Mayo y de Junio, y la mayoría de las variedades de pintos; *P. coccineus* formó parte de este grupo, eso sugiere que esta especie tiene en común secuencias genómicas, detectadas por el marcador BM53/AF483849, con las variedades cultivadas de colores diferentes al negro de *P. vulgaris*. Este par de iniciadores permitió genotipificar 23 de las 36 muestras de *Phaseolus*, porque presentan perfiles de amplificación únicos, las que no pueden ser tipificadas con ese par de iniciadores fueron las muestras 15 y 18, por compartir un mismo perfil de amplificación; por la misma razón, las muestras 24 y 25; 17, 19, 23, 10 y 13; 31 y 32; y 29 y 33 tampoco pueden ser tipificadas con ese marcador (Figura 5).

El par de iniciadores BM210/AF483902 formó dos grupos principales, y permitió genotipificar 30 de las 36 muestras de *Phaseolus*. La 10 y 11 presentaron perfiles idénticos, lo mismo la 23 y 28, y la 22 y la 25 (Figura 6). Este marcador formó también dos grupos principales, el grupo 2 incluyó 4 de las ocho variedades de color negro, las dos variedades Bayo, Pinto Saltillo (muestra 8) y Pinto Mestizo (muestra 7), y la silvestre amarillo (muestra 36), todas estas muestras se incluyeron también en el mismo grupo con el marcador BM53/AF483849. Todas las muestras que formaron el grupo 2 del marcador BM53/AF483849 se agruparon en el mismo grupo 1 con el marcador BM210/AF483902; estos dos marcadores tendieron a formar grupos que incluyeron a las mismas muestras de *Phaseolus*.

El par de iniciadores GATS91/AF483842 formó también dos grupos principales y permite genotipificar 20 de las 36 muestras de *Phaseolus* (Figura 7). Los grupos formados con este marcador fueron más heterogéneos que los formados con los otros dos marcadores SSR

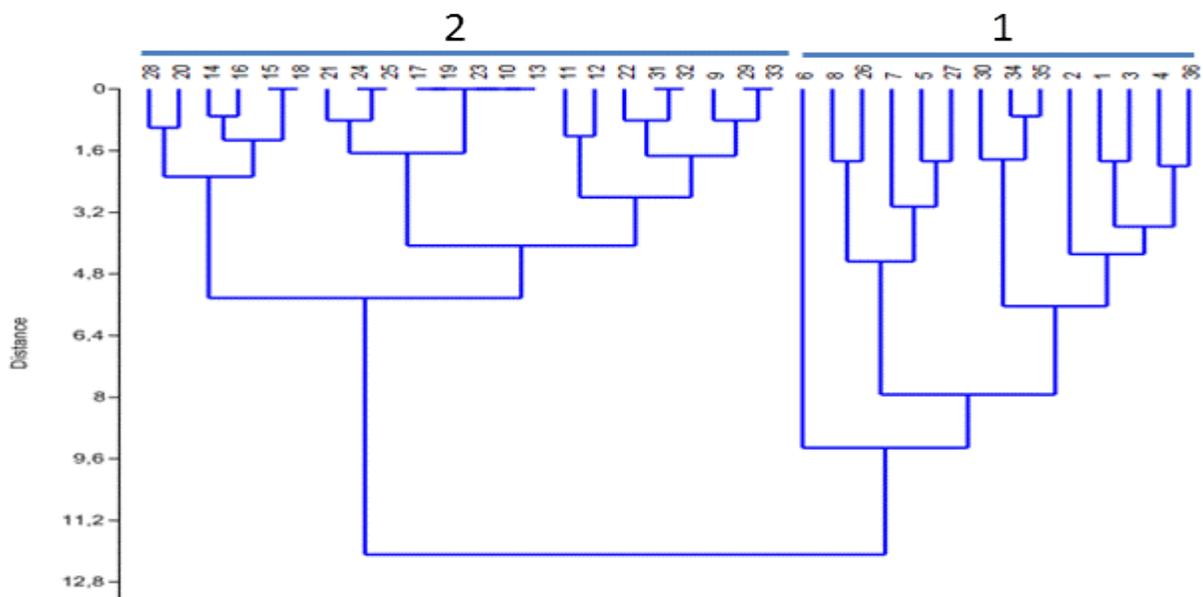


Fig 5. Dendrograma basado en las secuencias amplificadas por el par de iniciadores BM53/AF483849 de SSR en 35 variedades de *Phaseolus vulgaris* y en *P. coccineus*. Los números corresponden a las muestras descritas en la Tabla 1.

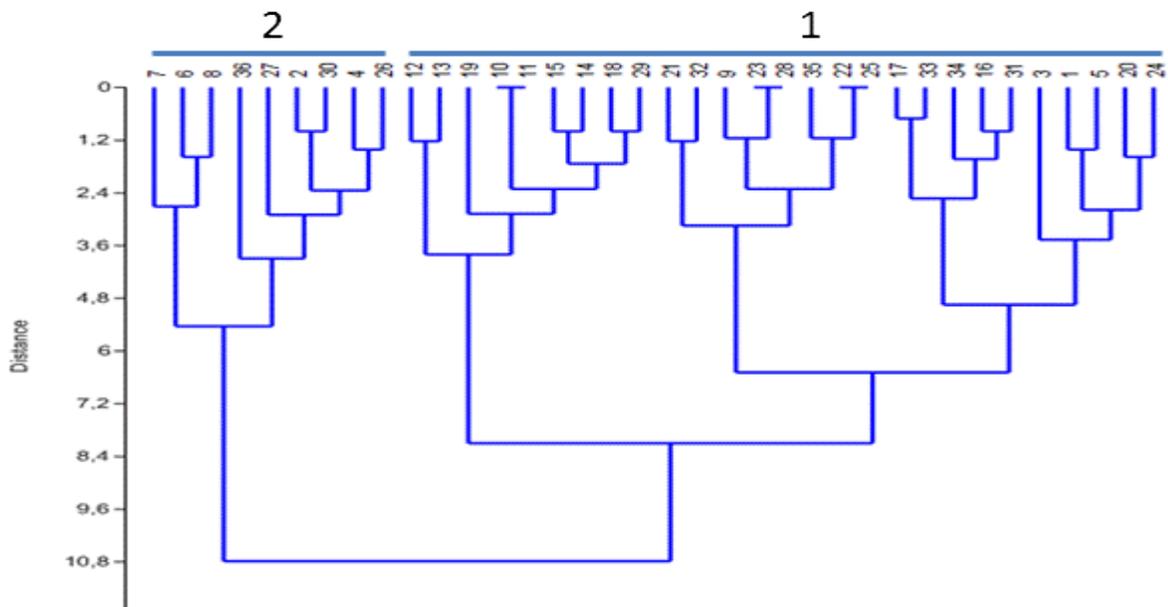


Fig 6. Dendrograma basado en las secuencias amplificadas por el par de iniciadores BM210/AF483902 de SSR en 35 variedades de *Phaseolus vulgaris* y en *P. coccineus*. Los números corresponden a las muestras descritas en la Tabla 1.

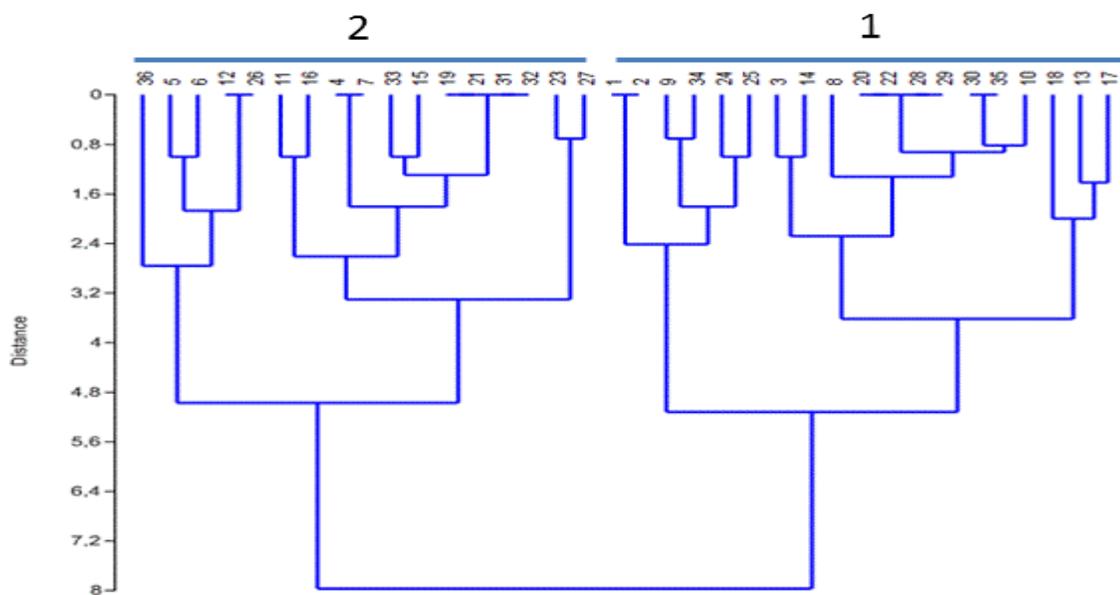


Fig 7. Dendrograma basado en las secuencias amplificadas por el par de iniciadores GATS91/AF483842 de SSR en 35 variedades de *Phaseolus vulgaris* y en *P. coccineus*. Los números corresponden a las muestras descritas en la Tabla 1.

La Tabla 11 muestra la variabilidad genética evaluada con el índice de Shannon así como el porcentaje de loci polimórfico de cada una de las 35 variedades de frijol común y de *P. coccineus*, de acuerdo al perfil de amplificación generado por cada uno de los tres pares de iniciadores de microsatélites (BM210/AF483902, BM53/AF483849 y GATS91/AF483842). La variabilidad más alta fue detectada por el par de iniciadores BM53/AF483849 ($H = 2.0807$). Los valores de H indican que en general las formas silvestres tuvieron los mayores niveles de variabilidad genética, la cual se ve disminuida en variedades que han sido manipuladas por el hombre para manifestar características morfológicas o agronómicas particulares.

Tabla 8. Loci amplificados por el par de iniciadores SSR BM53/AF483849 en 35 variedades de *Phaseolus vulgaris* y en *P. coccineus*

pb	Muestras																																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36		
588	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
531	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
480	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
434	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
392	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
354	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
320	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
289	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
261	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
236	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
213	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
193	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
174	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
157	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	
142	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
128	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	
116	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
104	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	
95	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
86	1	0	1	1	0	5	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	
77	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
63	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	

0: ausencia

1: presencia

Los números en la línea de variedades corresponden a los nombre de la Tabla 1

Tabla 9. Loci amplificados por el par de iniciadores SSR BM210/AF483902 en 35 variedades de *Phaseolus vulgaris* y en *P. coccineus*

Pb	Muestras																																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36		
976	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
797	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
588	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
456	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
320	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
304	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
289	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
261	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
236	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1		
224	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
213	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1		
193	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1		
186	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
183	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
165	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
157	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	
142	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
135	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	
128	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1		
122	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
116	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1		
104	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1		
95	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
86	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
77	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0

0: ausencia

1: presencia

Los números en la línea de variedades corresponden a los nombre de la Tabla 1

Tabla 10. Loci amplificados por el par de iniciadores SSR GATS91/AF483842 en 35 variedades de *Phaseolus vulgaris* y en *P. coccineus*

pb	Muestras																																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36			
323	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
310	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
289	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
285	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
280	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
267	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
261	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
254	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
243	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
221	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
199	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
188	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
174	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
162	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
148	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
127	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
79	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1		
70	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1		
61	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	

0: ausencia

1: presencia

Los números en la línea de variedades corresponden a los nombre de la Tabla 1

Tabla 11. Diversidad genética (índice de Shannon, H y polimorfismo, P) obtenidos para 35 variedades de frijol común y *Phaseolus coccineus*, con los iniciadores de microsatélites BM210/AF483902, BM53/AF483849, y GATS91/AF483842.

Número de muestra	Muestra	BM210/AF483902		BM53/AF483849		GATS91/AF483849	
		H	P (%)	H	P (%)	H	P (%)
1	Negro Zacatecas	0.0000	0.00	1.1935	66.67	0.6730	66.67
2	Negro San Luis	0.6931	66.67	0.6931	66.67	0.0000	0.00
3	Negro Altiplano	0.9489	66.67	1.3492	66.67	0.0000	0.00
4	Negro Vizcaya	1.0487	100.00	1.4950	100.00	0.6931	100.00
5	Negro V – 8025	0.6129	100.00	0.6931	100.00	0.6931	100.00
6	Negro Frijozac 101	1.0331	100.00	0.9489	100.00	0.6931	100.00
7	Pinto Mestizo	1.0549	100.00	1.0297	100.00	0.6931	100.00
8	Pinto Saltillo	1.2729	100.00	1.0961	100.00	0.1985	100.00
9	Canario Regional	0.0000	0.00	0.0000	0.00	0.6109	33.33
10	Azufrado Namiquipa	0.0000	0.00	0.6931	66.67	0.8979	66.67
11	Azufrado Higuera	0.0000	0.00	0.6931	66.67	1.0549	66.67
12	Flor de Mayo M-38	0.5004	100.00	0.9489	100.00	0.6931	100.00
13	Azufrado Pimono 78	0.0000	0.00	0.6931	66.67	0.6931	66.67
14	Río Grande Querétaro	0.0000	0.00	0.6931	66.67	0.6931	66.67
15	Pinto Libertad	0.0000	0.00	0.6931	66.67	0.6931	66.67
16	Vaquita	0.0000	0.00	0.6931	66.67	0.6931	66.67
17	Pinto Bravo	0.0000	0.00	0.6931	66.67	0.6931	66.67
18	Pinto Centenario	0.0000	0.00	0.6931	66.67	0.6931	66.67
19	Pinto Coloso	0.0000	0.00	0.6931	33.33	0.0000	0.00
20	Pinto Durango	0.5004	66.67	0.6931	66.67	0.0000	0.00
21	Pinto Bayacora	0.5182	66.67	0.6931	66.67	0.0000	0.00
22	Pinto Villa	0.6931	66.67	0.6931	66.67	0.0000	0.00
23	Flor de Mayo Sol	0.0000	0.00	0.6931	66.67	0.6931	66.67
24	Flor de Junio Ana	0.6931	100.00	0.6931	100.00	0.6931	100.00
25	Flor de Junio Marcela	0.6931	100.00	0.6931	100.00	0.6931	100.00
26	Bayo Madero	0.8261	100.00	1.3452	100.00	0.6931	100.00
27	Bayo Victoria	0.6474	100.00	0.6730	100.00	0.6931	100.00
28	F. M. 2000	0.6931	66.67	0.6931	66.67	0.0000	0.00
29	Pinto Centauro	0.6931	66.67	0.9489	66.67	0.0000	0.00
30	Negro Plus (Sinaloa)	1.0098	66.67	0.9433	66.67	0.0000	0.00
31	Pinto Saltillo (Sinaloa)	0.6931	66.67	0.6931	66.67	0.0000	0.00
32	Azufrado Higuera (Sinaloa)	0.6931	66.67	0.6881	66.67	0.0000	0.00
33	Patol (<i>Phaseolus coccineus</i>)	0.6931	66.67	0.6730	66.67	0.0000	0.00
34	Silvestre Negro	0.6390	66.67	1.0889	66.67	0.0000	0.00

35	Silvestre Café	0.8676	66.67	0.6931	66.67	0.0000	0.00
36	Silvestre Amarillo	1.5291	100.00	2.0807	100.00	1.5291	100.00

5.2.3 Análisis de ISSR

Los iniciadores 899 y 814 amplificaron un total de 66 loci, 35 con el iniciador 899 y 31 con el iniciador 814, con un número promedio de 33 loci por iniciador; este número promedio de loci fue mayor que el reportado por Svetleva *et al.* (2006), quienes encontraron 11.5 loci por iniciador ISSR de entre 13 analizados con 78 genotipos de *Phaseolus vulgaris*; fue mayor que el número promedio encontrado por Payró *et al.* (2004), quienes informaron un valor de 12.3 loci por iniciador ISSR de tres analizados para siete poblaciones de frijol común; y también fue mayor que el reportado por Vidal-Barahona *et al.* (2006), quienes encontraron un número promedio de 14.2 loci por iniciador ISSR para 4 analizados con 21 variedades de frijol negro; sin embargo, el valor encontrado en el presente estudio fue menor que el reportado por Lagunes-Espinoza *et al.* (2005), quienes encontraron un número promedio de loci por iniciador de 40.7 para cuatro iniciadores analizados en 22 genotipos de frijol común; y menor también que el reportado por Galván *et al.* (2003), quienes indicaron un promedio de 8.3 para nueve iniciadores evaluados en 13 accesiones de *Phaseolus vulgaris*. El tamaño molecular de los alelos amplificados con el iniciador 899 varió de 764 a 31 297 pb y con el iniciador 814 varió de 156 a 25 882 pb.

El resumen de las características de los iniciadores ISSR se muestra en la Tabla 12

Tabla 12 Resumen de la caracterización con los iniciadores ISSR 899 y 814 de 35 variedades de frijol común y *Phaseolus coccineus*.

Resumen por primer

Primer	BP	BM	BT	PMF(95)	PIC	E.E.	AMP	PDICMA	na*	ne*	H
899	35	0	35	1.00	0.29	0.01	36.19	2.30E-15	2.0000	1.4477	0.4879
814	31	0	31	1.00	0.31	0.02	63.17	4.70E-15	2.0000	1.4973	0.5143
Total	66	0	66					1.10E-29			
Promedio							49.68		2.0000	1.4725	0.5011

BP: número de bandas polimórficas; BM: número de bandas monomórficas; BT: número de bandas totales; PMF(95), la proporción de loci polimórficos al 95%; PIC:el contenido de información polimórfica (PIC); EE: el error estándar del PIC; AMP: el porcentaje de amplificación (porcentaje de datos iguales a 1); PDICMA, la probabilidad de que dos individuos compartan un mismo alelo por azar; na*: número de alelos observados; ne*: número de alelos esperados; H: índice de Shannon

Todos los loci amplificados fueron polimórficos (100%). El contenido de información polimórfica para estos iniciadores estuvo en el intervalo de 0.29 a 0.31; valores de PIC de marcadores ISSR para *Vigna umbellata*, reportados por Muthusamy *et al.* (2008) cayeron en el intervalo de 0.041 a 0.40; Velicevici *et al.* (2012) reportaron un intervalo de valores de PIC para iniciadores ISSR de 0.24 a 0.39 en cultivares de avena. A diferencia de los SSR, los ISSR son marcadores dominantes (Mousapour *et al.*, 2011) y el valor máximo que puede alcanzar el PIC es de 0.5 (Sehgal *et al.*, 2009), por lo que ambos marcadores ISSR usados en el presente trabajo detectaron un número alto de loci informativos que contribuyen a la variación entre las muestras de *Phaseolus*.

Los loci amplificados con los iniciadores ISSR 899 y 814 se muestran en las Tablas 13 y 14. Los resultados obtenidos mediante un análisis de agrupación basado en los perfiles de loci amplificados con el iniciador 899 formaron dos grupos principales, con este iniciador las muestras silvestres ni la 7 amplificaron alguna secuencia, por lo que no pueden ser genotipificados, como sí pueden serlo las 32 muestras restantes (Figura 8). El iniciador 814 formó dos grupos principales; las muestras silvestres (34 – 36) no amplificaron ninguna banda. Este iniciador también permite la genotipificación de la mayoría de las muestras de *Phaseolus* (Figura 9). El dendrograma basado en los loci amplificados de ambos

iniciadores ISSR se muestra en la Figura 10, indica una relación genética estrecha entre las tres muestras silvestres (34 – 36). Incluye en un mismo grupo a las tres muestras silvestres y al Pinto Mestizo (muestra 7), y con excepción de esas tres permite genotipificar las 32 variedades cultivadas de frijol común y a *P. coccineus*; sin embargo ninguno de los marcadores moleculares utilizados permitieron la discriminación específica entre *P. vulgaris* y *P. coccineus*, sugiriendo que las secuencias genéticas en las que se basan los marcadores moleculares utilizados son compartidas o conservadas entre ambas especies. Las muestras colectadas de manera silvestre fueron discriminadas claramente de las variedades cultivadas de frijol común por los marcadores ISSR; las secuencias SSR, que las formas silvestres comparten con las cultivadas, podrían indicar que aquellas representan plantas escapadas o “asilvestradas”, y que algunas de las muestras que presentaron perfiles idénticos de amplificación pudieran ser la misma variedad que ha recibido nombres diferentes en diferentes regiones del país.

La Tabla 15 muestra la variabilidad genética evaluada con el índice de Shannon así como el porcentaje de loci polimórfico de cada una de las 35 variedades de frijol común y de *P. coccineus*, de acuerdo al perfil de amplificación generado por cada uno de los dos pares de iniciadores de ISSR (899 y 814). Los marcadores ISSR revelaron menor variabilidad genética para las muestras de *Phaseolus*. Los valores de H y P indican que la variedad Negro Zacatecas (1) y Pinto Villa (22) tuvieron los mayores niveles de variabilidad genética.

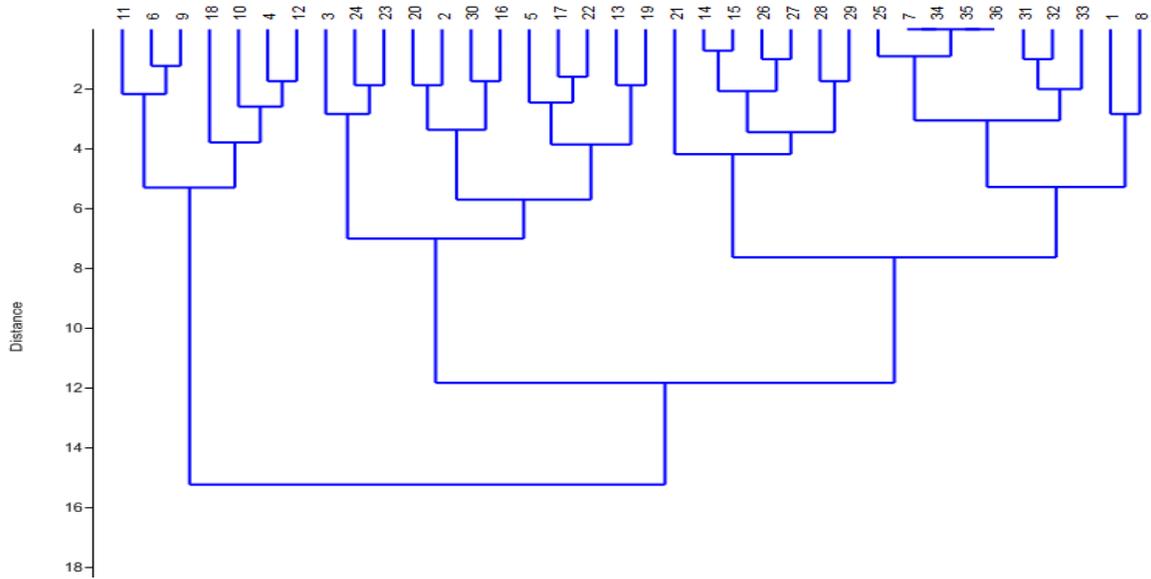


Fig 8. Dendrograma basado en las secuencias amplificadas por el iniciador 899 de ISSR en 35 variedades de *Phaseolus vulgaris* y en *P. coccineus*. Los números corresponden a las muestras descritas en la Tabla 1

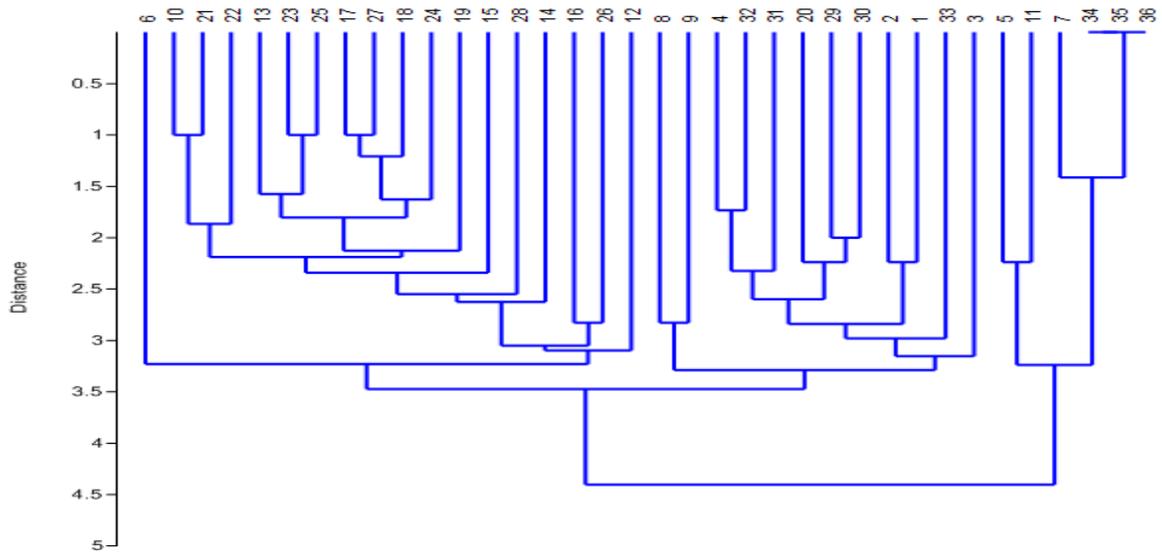


Fig 9. Dendrograma basado en las secuencias amplificadas por el iniciador 814 de SSR en 35 variedades de *Phaseolus vulgaris* y en *P. coccineus*. Los números corresponden a las muestras descritas en la Tabla 1.

Tabla 13 Loci amplificados por el iniciador ISSR 899 en 35 variedades de *Phaseolus vulgaris* y en *P. coccineus*.

pb	Variedades																																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36		
31297	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
30761	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
30234	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
29717	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
25439	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
25003	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24155	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
23741	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
22542	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
22156	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
21038	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
19297	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
18009	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17100	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
16237	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
7088	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6501	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
6067	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
5761	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5565	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
4932	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
4603	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4370	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
4078	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
3806	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	
3432	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
3041	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
2887	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
2649	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
2388	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	
2153	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0
1875	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1606	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
1007	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
764	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	

0: ausencia

1: presencia

Los números en la línea de variedades corresponden a los nombre de la Tabla 1

Tabla 14. Loci amplificados por el iniciador ISSR 814 en 35 variedades de *Phaseolus vulgaris* y en *P. coccineus*.

pb	Variedades																																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36			
25882	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
20559	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0		
18750	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	
17100	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	
15596	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0		
7129	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
5164	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	
4295	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	
3917	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	
3112	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
2710	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
2254	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
1963	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
1791	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
1489	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	
1183	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	
1079	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	
940	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	
747	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	
650	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	
541	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
471	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
392	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
341	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
311	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
271	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
247	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
225	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
196	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
179	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
156	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0: ausencia

1: presencia

Los números en la línea de variedades corresponden a los nombre de la Tabla 1

Tabla 15. Diversidad génica (índice de Shannon, H y polimorfismo, P) obtenidos para 35 variedades de frijol común y *Phaseolus coccineus*, con los iniciadores ISSR 899 y 814

Número de muestra	Muestra	899		814	
		H	P (%)	H	P (%)
1	Negro Zacatecas	0.6576	100.00	0.6886	100.00
2	Negro San Luis	0.0000	0.00	0.6876	50.00
3	Negro Altiplano	0.0000	0.00	0.6240	50.00
4	Negro Vizcaya	0.0000	0.00	0.0000	0.00
5	Negro V – 8025	0.0000	0.00	0.6240	50.00
6	Negro Frijozac 101	0.0000	0.00	0.0000	0.00
7	Pinto Mestizo	0.0000	0.00	0.4452	50.00
8	Pinto Saltillo	0.5337	100.00	0.6576	100.00
9	Canario Regional	0.0000	0.00	0.0000	0.00
10	Azufrado Namiquipa	0.0000	0.00	0.0000	0.00
11	Azufrado Higuera	0.6240	100.00	0.6876	100.00
12	Flor de Mayo M-38	0.0000	0.00	0.6876	50.00
13	Azufrado Pimono 78	0.6576	100.00	0.6876	100.00
14	Río Grande Querétaro	0.6576	50.00	0.0000	0.00
15	Pinto Libertad	0.6240	50.00	0.0000	0.00
16	Vaquita	0.0000	0.00	0.0000	0.00
17	Pinto Bravo	0.0000	0.00	0.0000	0.00
18	Pinto Centenario	0.0000	0.00	0.0000	0.00
19	Pinto Coloso	0.0000	0.00	0.6876	50.00
20	Pinto Durango	0.0000	0.00	0.6240	50.00
21	Pinto Bayacora	0.0000	0.00	0.0000	0.00
22	Pinto Villa	0.6886	50.00	0.0000	0.00
23	Flor de Mayo Sol	0.0000	0.00	0.6240	50.00
24	Flor de Junio Ana	0.0000	0.00	0.0000	0.00
25	Flor de Junio Marcela	0.0000	0.00	0.0000	0.00
26	Bayo Madero	0.0000	0.00	0.0000	0.00
27	Bayo Victoria	0.0000	0.00	0.0000	0.00
28	F. M. 2000	0.0000	0.00	0.0000	0.00
29	Pinto Centauro	0.0000	0.00	0.0000	0.00
30	Negro Plus (Sinaloa)	0.0000	0.00	0.0000	0.00
31	Pinto Saltillo (Sinaloa)	0.0000	0.00	0.0000	0.00
32	Azufrado Higuera (Sinaloa)	0.0000	0.00	0.0000	0.00
33	Patol (<i>Phaseolus coccineus</i>)	0.0000	0.00	0.0000	0.00
34	Silvestre Negro	0.0000	0.00	0.0000	0.00
35	Silvestre Café	0.0000	0.00	0.0000	0.00
36	Silvestre Amarillo	0.0000	0.00	0.0000	0.00

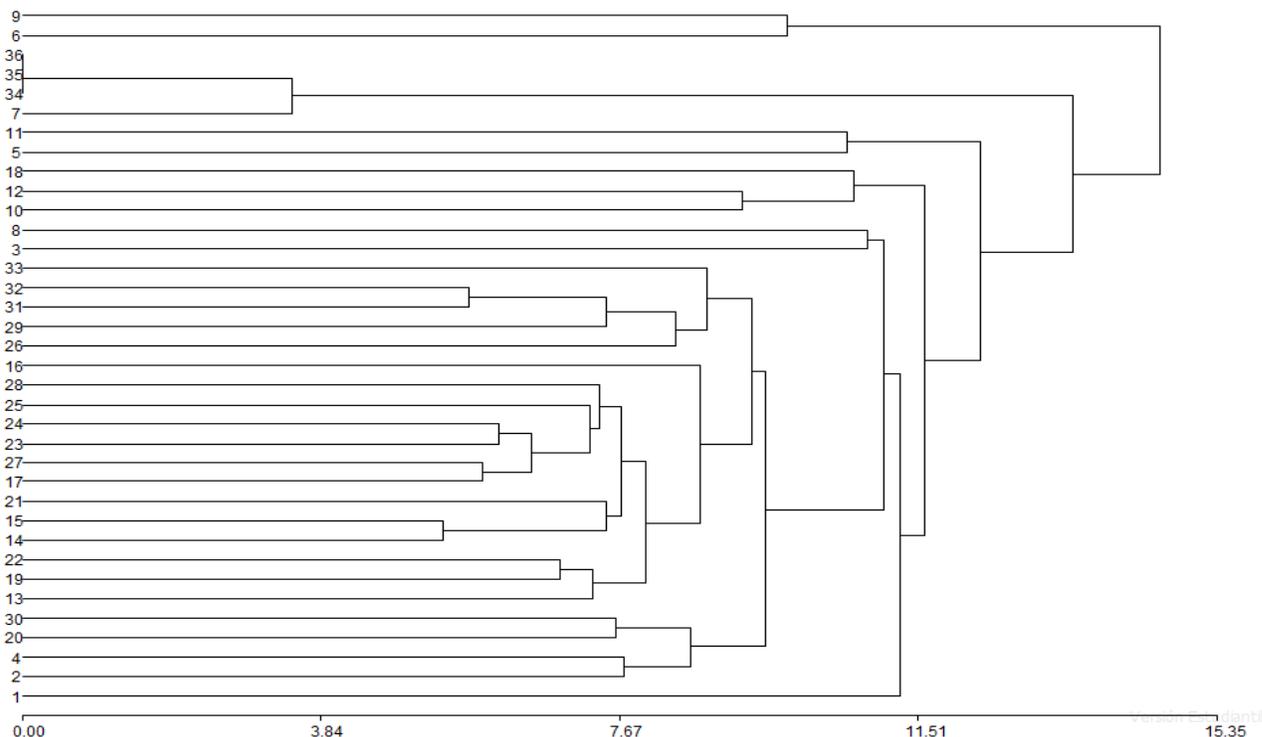


Fig 10. Dendrograma basado en las secuencias amplificadas por los iniciadores 814 y 899 en 36 muestras de *Phaseolus*. Los números corresponden a las muestras descritas en la Tabla 1.

5.3 Caracterización química

5.3.1 Contenido de fenoles y flavonoides

Los contenidos de fenoles totales variaron de manera significativa entre las diferentes muestras de *Phaseolus* (Tabla 16). Esos contenidos fueron menores que los que reportaron Ksouri *et al.* (2009) en hoja de *Tamarix gallica* (34.44 mg/g de tejido seco), que es una especie medicinal usada en Tunez. Los niveles de fenoles foliares de las muestras de *Phaseolus* también fueron menores a los reportados por Falleh *et al.* (2011) para las hojas de *Mesembryanthemum edule* (68.75 mg/g de tejido seco), las cuales son usadas en medicina tradicional en Africa.

Las hojas de las muestras de *Phaseolus* analizadas en el presente trabajo tuvieron concentraciones significativamente variables de flavonoides (Tabla 16), las cuales fueron menores que las reportadas por Falleh *et al.* (2011) para las hojas de *Mesembryanthemum edule* (22.21 mg/g de tejido seco) y más cercanas a las reportadas por Ksouri *et al.* (2009) en las hojas de *Tamarix gallica* (3.91 mg/g de tejido seco).

Los niveles de fenoles y flavonoides de *Phaseolus vulgaris* han sido estudiados en las semillas (Romani *et al.*, 2004) porque son estas las partes comestibles para los humanos. Sin embargo, determinar los niveles de esos compuestos en las hojas es de interés porque éstas se utilizan como forraje para el ganado y los fenoles presentes pueden tener efectos beneficios para la salud de los animales, o bien porque las hojas pueden tener potencial como fuente de antioxidantes naturales para uso humano.

5.3.2 Composición fenólica

Se encontró un total de 44 compuestos fenólicos en las hojas de las 36 muestras de *Phaseolus*. Los espectros UV y los tiempos de retención (TR) de los 44 compuestos se muestran en el Anexo 2. Los compuestos encontrados en las

Tabla 16. Fenoles totales, flavonoides totales, actividad bloqueadora de radicales libres (EC₅₀), capacidad antioxidante total (TAC) y potencial reductor de hierro (RP) de extractos foliares de plantas de 26 días de 32 variedades de *Phaseolus vulgaris* y de *Phaseolus coccineus*.

Muestra	Fenoles Totales (mg GAE/g ps)	Flavonoides Totales (mg QE/g ps)	EC ₅₀ (mg/mL)	TAC (mg EAA/mL)	RP (A _{700nm})
Bayo Victoria	5.602 ± 0.170 a	0.358 ± 0.0253 jklmno	2.450 ± 0.009 klm	13.655 ± 0.264 defghij	0.901 ± 0.016 ab
Pinto Bravo	5.269 ± 0.085 a	0.390 ± 0.0409 ijklmn	3.256 ± 0.020 c	11.111 ± 1.554 hijklmn	0.758 ± 0.006 fg
Azufrado Namiquipa	4.563 ± 0.331 b	0.556 ± 0.0464 e	2.024 ± 0.011 q	8.184 ± 1.059 mno	0.508 ± 0.006 o
Negro Vizcaya	4.485 ± 0.152 bc	0.321 ± 0.0240 lmnop	3.719 ± 0.019 a	15.733 ± 0.446 cdefg	0.751 ± 0.011 fg
Canario Regional	4.060 ± 0.173 bcd	0.290 ± 0.0235 nop	3.349 ± 0.026 b	15.988 ± 1.732 cdef	0.620 ± 0.004 lm
Negro San Luis	4.002 ± 0.068 cde	0.351 ± 0.0144 klmno	2.965 ± 0.018 e	19.932 ± 0.652 bc	0.765 ± 0.004 fg
FM 2000	3.840 ± 0.269 def	0.846 ± 0.0941 c	1.796 ± 0.007 r	7.803 ± 2.277 no	0.754 ± 0.012 fg
Azufrado Higuera	3.813 ± 0.076 def	0.420 ± 0.0032 hijkl	2.350 ± 0.004 n	8.439 ± 0.847 klmno	0.613 ± 0.003 m
Pinto Saltillo	3.577 ± 0.115 def	0.287 ± 0.0127 op	3.213 ± 0.002 c	12.553 ± 0.847 fghijkl	0.583 ± 0.008 n
Flor de Mayo M – 38	3.492 ± 0.273 efg	0.360 ± 0.0135 jklmno	2.914 ± 0.024 ef	16.242 ± 1.096 cdef	0.926 ± 0.002 a
<i>P. coccineus</i>	3.488 ± 0.091 efg	1.034 ± 0.0402 b	3.340 ± 0.012 b	9.329 ± 0.481 jklmno	0.464 ± 0.004 pq
Pinto Centauro	3.451 ± 0.071 fgh	0.681 ± 0.0205 d	2.444 ± 0.016 klm	14.843 ± 0.446 defgh	0.873 ± 0.009 b
Pinto Mestizo	3.381 ± 0.063 fghi	0.297 ± 0.0302 nop	2.711 ± 0.015 hi	14.122 ± 1.101 defghi	0.692 ± 0.004 j
Azufrado Pimono 78	3.008 ± 0.035 ghij	0.365 ± 0.0119 jklmno	2.362 ± 0.023 n	10.432 ± 0.661 ijklmn	0.661 ± 0.008 k
Flor de Junio Ana	3.002 ± 0.110 ghij	0.440 ± 0.0331 ghijk	2.399 ± 0.006 mn	17.090 ± 1.209 cd	0.648 ± 0.019 kl
Negro V 8025	2.946 ± 0.154 hijk	0.390 ± 0.0246 ijklmn	2.692 ± 0.008 i	11.238 ± 1.407 hijklmn	0.490 ± 0.002 op
Pinto Villa	2.917 ± 0.043 ijkl	0.249 ± 0.0173 p	2.481 ± 0.013 kl	24.512 ± 2.510 a	0.747 ± 0.004 gh
Pinto Saltillo Sinaloa	2.760 ± 0.155 jklm	0.512 ± 0.0311 efgh	2.790 ± 0.010 gh	2.247 ± 0.320 p	0.506 ± 0.012 o
Flor de Junio Marcela	2.733 ± 0.155 jklm	0.455 ± 0.0405 fghij	1.763 ± 0.010 r	22.094 ± 1.517 ab	0.832 ± 0.006 c
Pinto Durango	2.616 ± 0.138 jklmn	0.291 ± 0.0065 nop	3.065 ± 0.017 d	22.900 ± 1.376 ab	0.776 ± 0.010 ef
Negro Frijozac 101	2.614 ± 0.056 jklmn	0.311 ± 0.0202 mnop	2.717 ± 0.011 hi	12.595 ± 1.834 efghijkl	0.449 ± 0.003 q
Pinto Centenario	2.431 ± 0.131 klmno	0.530 ± 0.0106 efg	2.783 ± 0.026 gh	12.637 ± 1.418 efghijk	0.818 ± 0.009 cd
Pinto Coloso	2.389 ± 0.064 lmno	0.270 ± 0.0043 op	2.510 ± 0.013 jk	14.164 ± 2.558 defghi	0.803 ± 0.003 de
Bayo Madero	2.295 ± 0.038 mno	1.418 ± 0.0501 a	2.131 ± 0.008 p	22.688 ± 1.972 ab	0.829 ± 0.001 cd
Azufrado Higuera Sinaloa	2.148 ± 0.028 nop	0.336 ± 0.0240 lmnop	3.388 ± 0.041 b	3.011 ± 0.073 p	0.639 ± 0.010 klm
Flor de Mayo Sol	2.134 ± 0.161 nop	0.553 ± 0.0559 ef	1.474 ± 0.012 t	12.044 ± 0.264 fghijklmn	0.839 ± 0.014 c
Negro Zacatecas	2.015 ± 0.214 opq	0.293 ± 0.0059 nop	2.665 ± 0.018 i	16.921 ± 1.328 cde	0.721 ± 0.010 hi
Pinto Bayacora	1.750 ± 0.094 pqr	0.487 ± 0.0148 efghi	1.601 ± 0.022 s	11.068 ± 0.127 hijklmn	0.585 ± 0.007 n
Pinto Libertad	1.724 ± 0.482 pqr	0.322 ± 0.0263 lmnop	2.858 ± 0.017 fg	12.637 ± 0.920 efghijk	0.703 ± 0.007 ij
Negro Altiplano	1.699 ± 0.109 pqr	0.332 ± 0.0177 lmnop	2.584 ± 0.006 j	11.620 ± 1.036 ghijklmn	0.776 ± 0.006 ef
Negro Plus Sinaloa	1.525 ± 0.164 qr	0.400 ± 0.0303 ijklm	2.404 ± 0.102 lmn	5.216 ± 1.272 op	0.624 ± 0.008 lm
Rio Grande Queretaro	1.378 ± 0.135 rs	0.451 ± 0.0136 ghijk	2.195 ± 0.013 op	8.269 ± 1.749 lmno	0.662 ± 0.007 k
Vaquita	0.964 ± 0.048 s	0.309 ± 0.0295 mnop	2.270 ± 0.015 o	12.510 ± 1.909 fghijklm	0.721 ± 0.002 hi
Quercetina			0.400 ± 0.006 u	No Evaluado	0.780 ± 0.004 d
Quercetrina			1.293 ± 0.018 v	22.448 ± 0.815 a	0.395 ± 0.004 n
Ácido Cafeico			0.403 ± 0.003 u	No Evaluado	No Evaluado
Ácido Ascorbico			No Evaluado	No Evaluado	0.653 ± 0.005 h

hojas de las 35 variedades de *Phaseolus vulgaris* fueron: 15 quercetina-3-O-glicósidos, 12 canferol-3-O-glicósidos, dos canferol-3,7-O-diglicósidos, seis ácidos fenólicos, y cuatro miricetina glicósidos. El perfil fenólico foliar encontrado para *Phaseolus coccineus*, fue muy diferente, estuvo formado por dos canferol-3-O-glicósidos, dos apigenina-7-O-glicósidos y un luteolina-7-O-glicósido. En *P. coccineus* las flavonas fueron los compuestos principales (más abundantes y más concentrados) y en *P. vulgaris*, los más abundantes y presentes en más altas concentraciones fueron los flavonoles.

Se encontraron diferencias entre los perfiles fenólicos foliares de las variedades de *Phaseolus vulgaris*, ejemplos de esas diferencias se presentan en los cromatogramas del Anexo 3. El compuesto 25 (un glicósido-3-O de quercetina) estuvo presente en todas las variedades de frijol común y fue uno de los compuestos acumulados en mayor concentración.

La quercetina es un flavonol que tiene una reconocida actividad como antioxidante, debido a su estructura O-ortodihidroxi en el anillo B de su molécula (Rice-Evans, 1999). Derivados de quercetina han sido reportados en especies de plantas reconocidas por su favorable efecto sobre la salud humana, entre ellas se encuentra el *Gingko biloba* (Mouren *et al.*, 1994). La presencia de derivados de quercetina en los extractos de las hojas de *P. vulgaris* sugiere que esos compuestos pueden ser los principales responsables de las importantes propiedades antioxidantes encontradas en el presente trabajo en los extractos foliares de frijol común. En cada muestra de *P. vulgaris*, los glicósidos de quercetina representaron entre el 50% y 75%.

Derivados de canferol también se encontraron en los extractos foliares de *P. Vulgaris*. Estos compuestos no presentan una estructura O-ortodihidroxi en el anillo B, lo que hace que sus propiedades antioxidantes sean menores que las de los derivados de quercetina (Rice-Evans, 1999); en cambio tienen una importante actividad inhibitoria de las enzimas humanas histonadesacetilasas, y debido a que la actividad de esas enzimas está relacionada al desarrollo de cáncer en humanos, los compuestos que tienen un efecto inhibitorio de esas enzimas

actualmente están siendo estudiados como nuevos compuestos anticancerígenos terapéuticos y preventivos (Berger *et al.*, 2012). Chen y Chen (2013) y Lee *et al.* (2014) mencionan que el canferol que se encuentra en frutas y verduras, cebolla, manzana, te verde y negro, es de gran ayuda para evitar diferentes tipos de cáncer entre los que se encuentran cáncer de colon, de pulmón, próstata, y esófago. Derivados de canferol fueron los segundos compuestos más importantes por su abundancia en los extractos foliares de *P. vulgaris*, por lo que las hojas de las diferentes variedades pueden ser una fuente importante de compuestos anticancerígenos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que composición fenólica foliar es diferente a la de semillas, ya que Romani *et al.* (2004) encontraron cuatro canferol glicósidos, trazas de quercetina glicósidos, daidseína, genisteína, además de siete antocianinas, estas últimas presentes solo en la cascarilla de las semillas de cuatro cultivares Zolfino de *Phaseolus vulgaris*; los resultados de Beninger y Hosfield (1999) corroboran esas diferencias, ya que eso autores reportaron la presencia de dos glicósidos de quercetina, un glicósido de canferol, y proantocianidinas en las cascarillas de las semillas del cultivar “Montcalm Dark Red Kidney”, Beninger y Hosfield (1998) reportaron una composición fenólica de semillas del cultivar “New Mantecas-Type Dry” de frijol compun, formada por solamente dos glicósidos de canferol, la cual también es diferente a cualquier de las composiciones foliares encontradas en el presente estudio.

5.3.3 Variación de los perfiles fenólicos foliares

Los compuestos encontrados para cada muestra formaron su perfil fenólico. En la Tabla 17 se muestra la matriz binaria construida con los perfiles fenólicos de cada muestra.

Tabla 17. Matriz binaria construida con los perfiles fenólicos de cada una de las 36 muestras de *Phaseolus*.

Muestra	Compuesto																																												Total			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44				
1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	
2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
3	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
4	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
5	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	
6	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	
7	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	7
8	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
9	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	8
10	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	
11	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
12	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
13	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
14	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
15	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
16	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	8	
17	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
18	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
19	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
20	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	8
21	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	10
22	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
23	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
24	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	8
25	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
26	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	11
27	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
28	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	10	
29	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	
30	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	
31	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	5	
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	5

0: ausencia
1: presencia

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, indican que existe una riqueza importante de compuestos fenólicos en los tejidos foliares de las diferentes muestras de *Phaseolus* que fueron analizadas, de acuerdo a la revisión bibliográfica realizada, no existen reportes previos sobre la composición de fenoles de las hojas de *P. vulgaris* ni de *P. coccineus*.

Se encontró variabilidad en la composición de fenoles entre los diferentes cultivares. Los resultados de un análisis de agrupamiento (Figura 11) revelaron que cada cultivar tiene un perfil fenólico individual y que el perfil de *P. coccineus* lo ubica en un grupo independiente de todas las variedades de frijol común. Varios autores han reportado que los perfiles fenólicos tienen una tendencia especie-específica (Almaraz-Abarca *et al.*, 2013a,b). Esa tendencia se corrobora en el presente estudio para *P. vulgaris* y *P. coccineus*. En el presente estudio, además se encontró variación en la composición fenólica foliar entre cultivares de frijol común, la cual también tendió a ser específica para cada uno de ellos, es decir, cada cultivar tuvo un perfil fenólico típico, lo que hace a éstos perfiles importantes herramientas para la tipificación y para la determinación de autenticidad.

De acuerdo a la Figura 10, entre las variedades de color rosáceo y amarillo existe una mayor relación química y forman un solo grupo (2c), y los frijoles negros y pintos forman dos grupos (2b y 2d).

Las variaciones en la composición fenólica son el resultado de variaciones genéticas, ya que la síntesis de cada compuesto es el resultado de un orden secuencial en la ruta de la biosíntesis, en la que participan enzimas codificadas en genes individuales (Forkmann, 1994).

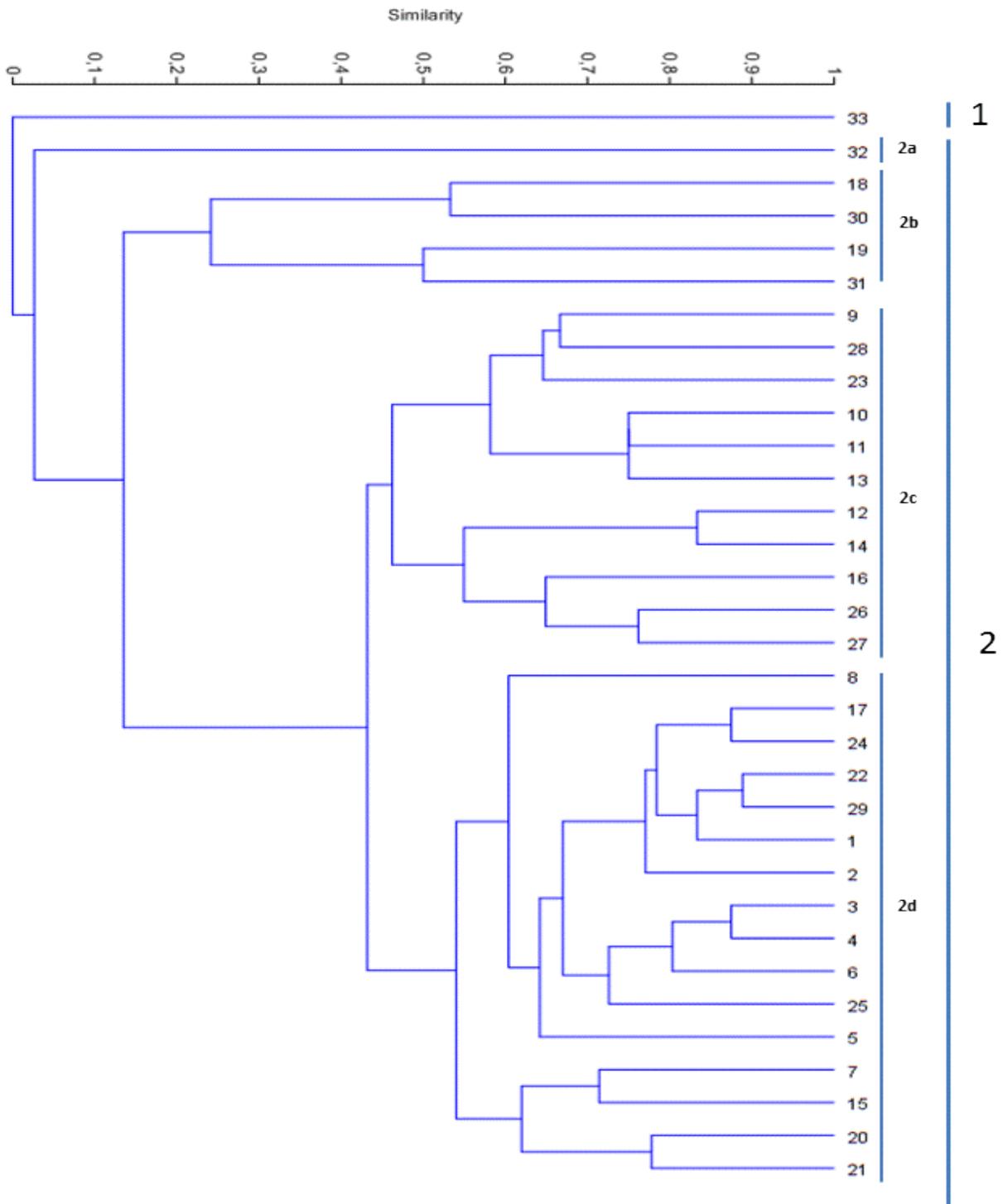


Fig. 11 Resultados de un análisis de agrupamiento comparando los perfiles fenólicos foliares de 32 variedades de *Phaseolus vulgaris* y de *P. coccineus*.

5.3.4 Capacidad antioxidante

Se observó una reducción lineal en la concentración de DPPH* asociada con el incremento en la concentración de flavonoides en los extractos, los valores de los coeficientes de correlación variaron entre 0.9307 y 0.9987. Los valores de EC₅₀ variaron significativamente entre las muestras de Phaseolus (Tabla 16). Los valores de EC₅₀ encontrados en el presente estudio fueron más altos que los encontrados en otras especies de plantas, como *Smallanthus sonchifolius* (EC₅₀ entre 11.3 y 50.7 µg/mL) reportado por Arnao *et al.* (2011). Las variedades Flor de Mayo Sol (EC₅₀ = 1.474 µg/mL) y Pinto Bayacora (EC₅₀ = 1.601 µg/mL) tuvieron valores de EC₅₀ similares a los encontrados en el presente estudio reportadas para la quercitrina (EC₅₀ = 1.293 µg/mL).

Los valores de TAC obtenidos se muestran en la Tabla 16. La variedad Pinto Villa fue la que tuvo el valor más alto el cual fue de (24.512 µg/mL), valor más alto que el obtenido para la quercitrina (22.408 µg/mL).

Los fenoles de los extractos foliares de Phaseolus mostraron una importante capacidad para donar electrones a radicales libres, esto contribuye a estabilizar especies reactivas (radicales libres) y terminar una reacción en cadena de oxidación, como es indicado por los valores de absorbancia a 700 nm mostrados en la Tabla 16, mientras más alto el valor de absorbancia, mayor capacidad reductora. Todos los extractos de *Phaseolus* mostraron mayor poder reductor de fierro que la quercitrina, 21 tuvieron poder reductor más alto que el ácido ascorbico, y 8 variedades tuvieron poder reductor más altos que la quercetina ($A_{700\text{ nm}} = 0.780$). Con excepción de las muestras Negro V8025 y Negro Frijozac 101, las cuales tuvieron valores de $A_{700\text{ nm}}$ de 0.490 y 0.449, respectivamente, todos los extractos foliares de *Phaseolus* evaluados mostraron capacidades reductoras más altas que las reportadas por Lue *et al.* (2010) para la rutina, un flavonoide que es un importante antioxidante natural, y sus derivados acilados, los cuales tuvieron valores de $A_{700\text{ nm}}$ entre 0.020 y 500.

6. Conclusiones

Las características morfométricas de las semillas de las variedades cultivadas de *Phaseolus vulgaris* fueron variables, sin una aparente correlación con el color. Las tres formas silvestres fueron las menores en dimensiones y peso.

Los ISSR permitieron tipificar las variedades cultivadas de frijol común analizadas, ya que cada una tuvo un perfil de amplificación típico. Los microsatélites permitieron la tipificación de la mayoría de esas variedades; exceptuando algunas como la variedad Negro Zacatecas (1) y la Negro San Luis (2), las cuales tuvieron perfiles de amplificación iguales entre sí con el marcador GATS91/AF483842.

Los microsatélites no permitieron discriminar las formas silvestres de frijol común ni *Phaseolus coccineus* de las variedades cultivadas de *P. vulgaris*, esto sugiere que en algún grado, las secuencias amplificadas por esos marcadores son comunes entre esas muestras, debido a un flujo génico pasado o presente ocurrido entre ellas.

Los ISSR permitieron discriminar las formas silvestres de frijol común del resto de las muestras de *Phaseolus* analizadas, excepto de la variedad cultivada Pinto Mestizo (7). Ni aquellas ni esta última amplificaron algún loci ISSR, indicando que no comparten las secuencias espaciadoras que separan los microsatélites correspondientes a los iniciadores 899 y 814 con el resto de las muestras de *Phaseolus*.

Ambos tipos de marcadores moleculares revelaron baja variabilidad genética en todas las muestras de *Phaseolus*; sin embargo, de manera relativa, los microsatélites revelaron mayor variabilidad en las formas silvestres que en las cultivadas, la menor variabilidad de estas últimas puede estar asociada a la manipulación humana para homogeneizar características en las variedades cultivadas.

Phaseolus vulgaris puede sintetizar y acumular una riqueza de compuestos fenólicos, que varía de 4 a 14 compuestos, en las hojas, principalmente derivados 3-O-glicósidos de quercetina.

La síntesis y acumulación de compuestos fenólicos en las hojas tiene una tendencia especie-específica y varietal-específica en *Phaseolus vulgaris*, lo que hace a los perfiles fenólicos foliares importantes quimiomarcadores que pueden ser útiles para la determinación de la autenticidad de variedades cultivadas.

Las hojas de *Phaseolus vulgaris* sintetizan flavonoles como los compuestos más importantes en términos de abundancia y concentración, mientras que las hojas de *P. coccineus* sintetizan flavonas como los compuestos fenólicos más importantes.

Los altos niveles de derivados 3-O-glicósidos de quercetina y los altos valores de capacidad antioxidante encontrada para los extractos de hojas sugieren que el frijol común es una fuente importante de antioxidantes naturales, que pueden tener un efecto benéfico en la salud animal, ya que las hojas sirven como forraje para el ganado.

La presencia de derivados 3-O-glicósidos de canferol revela al frijol común como una fuente importante de compuestos anticancerígenos debido a la propiedad que tienen esos compuestos de inhibir enzimas relacionadas con el desarrollo de cáncer en humanos.

7. Sugerencias

Se recomienda que se lleven a cabo más análisis con iniciadores SSR e ISSR en diferentes combinaciones y con mayor cantidad, lo que ayudará a determinar el mejor iniciador con un Contenido de Información Polimorfo alto (SSR $0.00 < PIC < 1.00$ e ISSR $0.00 < PIC < 0.50$), lo que permitirá la autenticación y certificación de los cultivares, tanto silvestres, asilvestrados y cultivados

Buscar el uso de los derivados glicosidos de quercetina y de canferol de *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus coccineus*, para el tratamiento de enfermedades mediante el uso de medicamentos con base en estos compuestos.

Se exorta a llevar a cabo estudios y análisis de proteínas en material foliar, tratando de introducir al mercado un producto con un alto contenido protéico que pueda servir como suplemento alimenticio.

Este trabajo, puede servir como base para futuros estudios sobre lo que sería la huella genética enfocada a la certificación y autenticación de semilla, lo que le daría un plus como producto de venta al usuario final, o como posible medicamento para tratar problemas de andropausia, menopausia, gastrointestinales, cardiacos o de cáncer, así mismo mediante un proceso industrial, llevar al ser humano un producto nutraceutico con alto contenido proteico, lo que permitirá tener un uso más extenso a nivel regional.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abdala, L. R., P. Seelmann. 1995. Flavonoids in *Tagetes zipaquirensis* and their chemosystematic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, 23, 871-872.
- Acosta-Gallegos, J.A., J.D. Kelly, P. Gepts. 2007. Prebreeding in common bean and use of genetic diversity from wild germoplasm. *Crop Science*, 47, 544-559.
- Almaraz-Abarca, N., M.S. González-Elizondo, M.G. Campos, Z.E. Ávila-Sevilla, E. A. Delgado-Alvarado, J.A. Ávila-Reyes. 2013a. Variability of the foliar phenol profiles of the *Agave victoriae-reginae* complex (Agavaceae). *Botanical Sciences*, 91, 295-306.
- Almaraz-Abarca, N., D.M. Rivera-Rodríguez, D. Arraéz-Román, A. Segura-Carretero, J.J. Sánchez-González, A. Delgado-Alvarado, J.A. Ávila-Reyes. 2013b. Los fenoles del polen del género *Zea*. *Acta Botanica Mexicana*, 105, 59-85.
- Almaraz-Abarca, N., Campos, M. G., Ávila-Reyes, J. A., Naranjo-Jiménez, N., Herrera-Corral, J., González-Valdez, L. S. 2007. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 119-124.
- Almaraz-Abarca, N., M.S. González-Elizondo, J.A. Tena-Flores, J.A. Ávila-Reyes, J. Herrera-Corral, N. Naranjo-Jiménez. 2006. Foliar flavonoids distinguish *Pinus leiophylla* and *Pinus chihuahuana* (Coniferales: Pinaceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 119, 426-436.
- Ames, B.N., M.K. Shigenaga, T.M. Hagen. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90, 7915-7922.
- Andrews, A.T. 1994. Electrophoresis of nucleic acids. In: Brown, T.A. (Ed.). *Essential Molecular Biology. A Practical Approach*: pp. 89-106. IRL Press, New York, USA.
- Aragao, F.J.L., R.P.V. Brondani, M.L. Burle. 2011. *Phaseolus*. In: Kole, C. (Ed.). *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*: pp 223-236. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.
- Arnao, I., J. Seminario, R. Cisneros, J. Trabucco. 2011. Antioxidant potential of 10 yacon *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson accessions native from Cajamarca – Peru. *Anales de la Facultad de Medicina*, 72, 239-243.
- Arús, P., J. Moreno-González. 1993. Marker-assisted selection. In: Hayward, M. D., N.O. Bosemark, I. Romagosa (Eds.). *Plant Breeding: Principles and Prospects*: pp 314-331. Chapman & Hall. London, UK.

Baev, P.V., L.D. Penev. 1995. BIODIV: program for calculating biological diversity parameters, similarity, niche overlap, and cluster analysis. Version 5.1. Pensoft. Sofia-Moscow, Russia.

Balzarini, M., J. Di Rienzo. 2004. *Info-Gen*: Software para análisis estadístico de datos genéticos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.info-gen.com.ar>

Benchimol, L.L., T. de Campos, S.A. Morais Carbonell, C. Augusto Colombo, A. Fernando Chioratto, E. Fernandes Formighieri, L.R. Lima Gouvea, A. Pereira de Souza. 2007. Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54, 1747-1762.

Beninger, C.W., G.L. Hosfield. 1999. Flavonol glycosides from Montcalm dark red kidney bean: implications for the genetics of seed coat color in *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4079-4082.

Beninger, C.W., G.L. Hosfield. 1998. Flavonol glycosides from the seed coat of a New Manteca-Type Dry Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2906-2910.

Berger, A., S. Venturelli, M. Kallnisdhkies, A. Bocker, C. Busch, T. Weiland, S. Noor, C. Lechner, T.S. Weiss, U.M. Lauer, S.C. Bischoff, M. Biltzer. 2012. Kaempferol, a new nutrition-derived pan-inhibitor of human histone deacetylases. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 977-985.

Berghe, W.V. 2012. Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: lifelong remodeling of our epigenomes. *Pharmacological Research*, 65, 565-576.

Berglund-Brucher, O., H. Brucher. 1976. The South American wild bean (*Phaseolus aborigineus* Burk.) as ancestor of the common bean. *Economic Botany*, 30, 257-272.

Bitochi, E., E. Bellucci, A. Giordano, D. Rau, M. Rodríguez, E. Biagetti, R. Santilocchi, Z. P. Spagnoletti, T Gioia, G. Logozzo, G. Attene, L. Nanni, R. Papa. 2013. Molecular analysis of the parallel domestication of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. *New Phytologist*, 197, 300-313.

Bornet, B., M. Branchard. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19, 209-215.

Cabral, P.D.S., T.C.B. Soares, A.B.P. Lima, F.D. de Miranda, F.B. Souza, L.S.A. Goncalves. 2011. Genetic diversity in local and comercial dry bean (*Phaseolus vulgaris*) accessions based on microsatellite markers. *Genetic and Molecular Research*, 10, 140-149.

Campos, R.M.G. 1997. Caracterização do polen apícola pelo seu perfil em compostos fenólicos e pesquisa de algumas actividades biológicas. Dissertação de candidatura ao grau de doutor. Universidade de Coimbra, Portugal.

Campos, M.G., K.R. Markham. 2007. Structure Information from HPLC and on-line Measured Absorption Spectra: Flavones, Flavonols and Phenolic Acids. Coimbra University Press. Portugal.

CEFP (Centro de Estudos de Finanças Públicas). 2013. Análisis mensual de productos básicos. apbcefp/002/2013.

Chan, T.W.V. 1992. Extraction of nucleic acids from clinical samples and cultured cells. In: Herrington, C. S., J. O'D. McGee. (Eds.). Diagnostic Molecular Pathology. A Practical Approach: pp. 1-23. IRL Press, New York, UK.

Chen, A.Y., Y.C. Chen. 2013. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*, 138, 2099-2107.

Coelho, R.C., M.A. Faria, J. Rocha, A. Reis, M.B.P.P. Oliveira, E. Nunes. 2009. Assessing genetic variability in germplasm of *Phaseolus vulgaris* L. collected in Northern Portugal. *Scientia Horticulture*, 122, 333-338.

Cota-Sánchez, J.H., K. Remrchuk, K. Ubayasena. 2006. Ready to use DNA extracted with CTAB method adapted for Herbarium specimens and mucilaginous plant tissue. *Plant Molecular Biology Reporter*, 24, 161-167.

Culley, M.T., A.D. Wolfe. 2001. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity*, 86, 545-556.

Devey M.E., J.C. Bell, D.N. Smith, D.B. Neale, G.F. Moran. 1996. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 92, 673-679.

Dinelli, G., A. Bonetti, M. Minelli, I. Marotti, P. Catizone, A. Mazzanti. 2006. Content of flavonoids in Italian bean (*Phaseolus vulgaris* L) ecotypes. *Food Chemistry*, 90, 105-114.

Echt, C.S., L. De Verno, M. Arzide, G.G. Vendramin. 1998. Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa*. *Molecular Ecology*, 7, 307-309.

Edwards, A., A. Civetello, H.A. Hammond, T. Caskey. 1991. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics*, 49, 746-756.

Falleh, H., R. Ksouri, F. Medini, S. Guyot, C. Abdelly, C. Magné. 2011. Antioxidant activity and phenolic composition of the medicinal and edible halophyte *Mesembryanthemum edule* L. *Industrial Crops and Products*, 34, 1066-1071.

Fiasson, J.L., K. Gluchoff-Fiasson, G. Dahlgren. 1997. Flavonoid patterns in European *Ranunculus* L. subgenus *Batrachium* (Ranunculaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 25, 327-333.

Forkmann, G. 1994. Genetics of flavonoids, in: Harborne, J. (Ed.). *The Flavonoids: Advances in Research*: pp. 537-564. Chapman & Hall. London, UK.

Freytag, G.F., D.G. Debouck. 2002. Taxonomy, Distribution, and Ecology of the Genus *Phaseolus* in North America, Mexico and Central America. Botanical Research Institute, Fort Worth.

Gaitán-Solís, E., M.C. Duque, K.J. Edwards, J. Thome. 2002. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* spp. *Crop Science*, 42, 2128-2136.

Gale, M.D. 1994. Genetic markers, maps and wheat breeding. *Journal of the Royal Agricultural Society of England*, 155, 162-176.

Galván, M.Z., B. Bernet, P.A. Balatti, M. Branchard. 2003. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica*, 132, 297-301.

García, A., J. Lasa. 1991. Ensayos de vigor de nascencia, revision bibliografica. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Estación Experimental de Aula DEI, Zaragoza, España.

Gepts, P., F.J.L. Aragão, E. de Barros, M.W. Blair, R. Brondani, W. Broughton, I. Galasso, G. Hernández, J. Kami, P. Lariguet, P. McClean, M. Melotto, P. Miklas, P. Pauls, A. Pedrosa-Harand, T. Porch, F. Sánchez, F. Sparvoli, K. Yu. 2008. Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. In: Moore, P.H., R. Ming (Eds.). *Genomics of Tropical Crop Plants*: pp. 113-143. Springer, New York, USA.

Gepts, P. 1986. Origin and evolution of cultivated *Phaseolus* species. In: B. Pickersgill, B., J.M. Lock (Eds.). *Advances in Legume Systematics part 8: Legumes of Economic Importance*: pp. 65-74. Kew Royal Botanic Gardens, UK.

Gepts P. 2001. *Phaseolus vulgaris* (bean). In: Brenner, S., J.H. Miller (Eds.). *Encyclopedia of Genetics*: pp 1444-1445. Academic Press, London, UK.

Golstein D.B., D.D. Pollok. 1994. Least-squares estimation of molecular distance – noise abatement in phylogenetic reconstruction. *Theoretical Applied Genetics*, 12, 432-440.

Golstein D.B., L.A. Zhivotovsky, K. Nayar, L.A. Ruíz, L.L. Cavalli-Sforza, M.W. Feltman. 1996. Statistical properties of the variation at linked microsatellite loci:

implications for the history of human Y-chromosome. *Molecular Biology and Evolution*, 13, 1213-1218.

González, A., X. Aguirre. 2007. Breve revisión de marcadores moleculares. En: Eguiarte, L. E., V. Souza, X. Aguirre. (Eds.). *Ecología Molecular*: pp. 567-571. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales–Instituto Nacional de Ecología–Universidad Nacional Autónoma de México–Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D. F.

González Torres, R.I., R. Araya Villalobos, E. Gaitán Solís, D.G. Debouck. 2004. Wild common bean in the Central Valley of Costa Rica: ecological distribution and molecular characterization. *Agronomía Mesoamericana*, 15, 145-153.

Guachambala-Cando, M.S., J.C. Rosas-Sotomayor. 2010. Caracterización molecular de accesiones cultivadas y silvestres de frijol común de Honduras. *Agronomía Mesoamericana*, 21, 51-61.

http://www.savingourseeds.org/pdf/pepper_sample_page.pdf [February 2014].

Guerra-Sanz, J.M. 2006. New SSR markers of *Phaseolus vulgaris* from sequence databases. *Plant Breeding*, 123, 87-89.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 1, 9. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

Hernández, T., I. Estrella, M. Dueñas, B. Fernández de Simón, E. Cadahía. 2007. Influence of good origin in the polyphenolic composition of a Spanish red wine aging in bottle, alter storage in barrels of Spanish, French and American oak wood. *European Food Research and Technology*, 224: 695-705.

Herrmann, R.G. 1982. The preparation of circular DNA from plastids. In: Edelman, M., R. Hallick, N.H. Chua (Eds.). *Methods in Chloroplast Molecular Biology*: pp. 259-280. Elsevier, Amsterdam, Holland.

Hoy, D.J., E.E. Gamble. 1985. The effects of seed size and seed density on germination and vigor in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Canadian Journal of Plant Science*, 65, 1-8.

Johnson, R.R, L.W. Wax. 1978. Relationship of soybean germination and vigor tests to field performance. *Agronomy Journal*, 70, 273-278.

Joven J, E. Espinel, A. Rull, G. Aragonés, E. Rodríguez-Gallego, J. Camps, V. Micol, M. Herrans-López, J.A. Menendez, I. Borrás, A. Segura-Carretero, C. Alonso-Villaverde, R. Beltrán-Debón. 2012. Plant-derived polyphenols regulate expresión of miRNA paralogs miR-103/107 and miRNA-122 and prevent diet-induced fatty liver disease in hyperlipidemic mice. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1820, 894-899.

Kaplan, L. 1981. What is the origin of the common bean? *Economic Botany*, 35, 240-254.

Kaplan, L., T.F. Lynch. 1999. *Phaseolus* (Fabaceae) in archaeology: AMS radiocarbon dates and their significance for pre-Colombian agriculture. *Economic Botany*, 53, 261-272.

Keb-Llanes, M., G. González, B. Chi-Manzanero, D. Infante. 2002. A rapid and simple method for small scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20, 299a-299e.

Khaidizar, M.I., K. Haliloglu, E. Elkoca, M. Aydin, F. Kantar. 2012. Genetic diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces grown in Northeast Anatolia of Turkey assessed with simple sequence repeat markers. *Turkish Journal of Field Crops*, 17, 145-150.

Kim, C.S., C.H. Lee, J.S. Shin, Y.S. Chung, N.I. Hyung. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acid Research*, 25, 1085-1086.

Ksouri, R., H. Falleh, W. Megdiche, N. Trabelsi, B. Mhamdi, K. Chaieb, A. Bakrouf, C. Magne, C. Abdelly. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food Chemical Toxicology*, 47, 2083-209

Kucera, B., G. Leubner-Metzger, E. Wellmann. 2003. Distinct ultraviolet-signaling pathways in bean leaves. DNA damage is associated with β -1, 3-glucanase gene induction, but not with flavonoid formation. *Plant Physiology*, 133, 1445-1452.

Kwak, M., J.A. Kami, P. Gepts. 2009. The putative Mesoamerican domestication center of *Phaseolus vulgaris* is located in the Lerma–Santiago Basin of Mexico. *Crop Science*, 49, 554-563.

Lauranson-Broyer, J., P. Lebreton. 1993. Flavonoids and morphological traits of needles, as markers of natural hybridization between *Pinus uncinata* Ram and *Pinus sylvestris* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21, 241-247.

Lagunes-Espinoza, L.C., A. Vidal Barahona, E. Valadez-Moctezuma, C.F. Ortiz García. 2005. Evaluación de marcadores ISSR para diferenciar cultivares criollos y mejorados de frijol negro en el trópico húmedo. Memorias del XI Congreso de Biotecnología y Bioingeniería. Mérida, Yucatan, México.

Lee, H.S., H.J. Cho, R. Yu, K. W. Lee, H. S. Chun, J. H. Yoon Park. 2014. Mechanisms underlying apoptosis-inducing effects of kaempferol in HT-29 human colon cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 2722-2737.

Litt, M., J.A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle gene. *American Journal of Human Genetics*, 44, 97-401.

Mabry, T. J., K. M. Markham, M. B. Thomas. 1970. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag. New York, USA.

Madhavi, D.L., D.K. Salunkhe. 1995. Toxicological aspects of food antioxidants. In: Madhavi, D.L., S.S. Deshpande, D.K. Salunkhe. (Eds.). Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives: pp. 267-360. Marcel Dekker, New York, USA.

Magurran, A.E. 1988. Ecological diversity and its measurement. Princeton. University Press Princeton. New Jersey, USA.

Marino, M., P. Bulzomi. 2009. Mechanisms at the root of flavonoid action in cancer: a step toward solving the Rubik's cube. In: Keller, R.B. (Ed.). Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources: pp. 230-248. Nova Sciences Publishers. New York, USA.

Markham, K. R. 1982. Techniques of Flavonoid Identification. Academic press, London, UK.

Marotti, I., A. Bonetti, M. Minelli, P. Catizone, D. Dinelli. 2007. Characterization of some Italian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces by RAPD, semirandom and ISSR molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54, 175-188.

Martins, S.R., F.J. Vences, L.E.S. Miera, M.R. Barroso, V. Carnide. 2006. RAPD analysis of genetic diversity among and within Portuguese landraces of common white bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Scientia Horticulturae*, 108, 133-142.

Masi, P., P.L. S. Zeuli, P. Donini. 2003. Development and analysis of multiplex microsatellite markers set in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Breeding*, 11, 303-313.

McCormack, J.H. 2006. Bean seed production - An organic seed production manual for seed growers in the Mid-Atlantic and Southern U.S. <http://www.gardenmedicinals.com>

Métais, I., B. Hamon, R. Jalouzot, D. Peltier. 2002. Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 1346-1352.

Miranda Colin, S., 1968. Origen de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común). *Agronomia Tropical*, 18, 191-205.

Mouren, X., P. Caillard, F. Schwartz. 1994. Study of the antiischemic action of EGb 761 in the treatment of peripheral arterial occlusive disease by TcPo2 determination. *Angiology*, 45, 413-417.

Mousapour, A. G., P. Poczai, Z. Polgar, J. Taller. 2011. Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCOT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. *American Journal of Potato Research*, 88: 226-237.

Muthusamy, S., S. Kanagarajan, S. Ponnusamy. 2008. Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11, 1-10

Nodari, R.O., E.M. K. Koinange, J.D. Kelly, P. Gepts. 1992. Towards an integrated linkage map of common bean: 1. Development of genomic DNA probes and levels of restriction fragment length polymorphism. *Theoretical and Applied Genetics*, 84, 186-192.

Ortega, S.V. 1974. Polinización cruzada natural de la caraota (*P. vulgaris* L.) en Venezuela. *Agronomía Tropical*, 24, 27-32.

Palmer, J.D. 1987. Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *The American Naturalist*, 130, 6-29.

Park, S.J., T.E. Michaels, J.R. Myers, D.W. A. Hunt, K. Stewart-William. 1996. Outcrossing rates of common beans grow in Ontario and Idaho. *Annual Report-Bean Improvement Cooperative*, 39, 90-91.

Payró de la Cruz, E., P. Gepts, P. Colunga-García Marín, D. Zizumbo-Villarreal. 2005. Spatial distribution of genetic diversity in wild populations of *Phaseolus vulgaris* L. from Guanajuato and Michoacán, México. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52, 589-599.

Peet, R.K. 1974. The measurement of species diversity. *Annual Review of Ecological and Systematics*, 5, 285-307.

Pérez de la Vega, M. 1997. Marcadores moleculares, variabilidad genética y evolución. III Simposio Científico en Biología Celular y Molecular. Universidad de la Coruña, 1, 247-266.

Pérez de la Vega, M. 1993. Biochemical characterization of populations. In: Hayward, M.D., N.O. Bosemark, I. Romagosa (Eds.). *Plant Breeding: Principles and Prospects*: pp 184-200. Chapman & Hall. London, UK.

Ponciano-Samayoa, K.M., J.C. Villatoro-Mperida, L.G. Molina-Monterroso. 2009. Caracterización preliminar con microsatélites de la colección guatemalteca de frijol común trepador. *Agronomía Mesoamericana*, 20, 245-254.

Powell, W., M. Morgantet, C. Andre, J.W. McNicol, G.C. Machray, J.J. Doyle, S.V. Tingeyt, J.A. Rafalski. 1995. Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Current Biology*, 5, 1023-1029.

- Prieto, P., M. Pineda, M. Aguilar. 1999. Spectrometric quantization of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337-341.
- Provan, J., N. Soranzo, N.J. Wilson, D.B. Gostein, W. Powell. 1999. A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics*, 153, 943-947.
- Queller D.C., J.E. Strassmann, C.R. Hughes. 1993. Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution*, 8, 285-289.
- Rajadurai, M., S.M. Prince. 2007. Preventive effect of naringenin on cardiac markers, electrocardiographic patterns and lysosomal hydrolases in normal and isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. *Toxicology*, 230, 178-188.
- Ramírez Pérez, A.R. 2011. Diversidad agrónomica, morfológica y molecular en variedades nativas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas por agricultores en el estado de Puebla. Tesis de maestría. Colegio de Posgraduados, Puebla, México.
- Rentaría Alcántara, M. 2007. Breve revisión de marcadores moleculares. En: Eguiarte, L.E., V. Souza, X. Aguirre (Eds.). *Ecología Molecular*: pp. 541-566. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales–Instituto Nacional de Ecología–Universidad Nacional Autónoma de México–Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D. F.
- Reyes, R.E., L.E. Padilla Bernal, O. Pérez Reyna, P. López Jaquez. 2008. Historia, naturaleza y cualidades alimentarias del frijol. *Investigación Científica*, 4, 1-21.
- Rice-Evans, C. 1999. Screening of phenolics and flavonoids for antioxidant activity. In: Packer L, M. Hiramatsu, T. Yoshikawa. (Eds.). *Antioxidant food supplements in human health*: pp. 239-253. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Rieger, R., A. Michealis, M.M. Green. 1982. *Diccionario de Genética y Citogenética Clásica y Molecular*. Alhambra, Madrid.
- Rodiño, A.P., M. Santalla, A.M. González, A.M. de Ron, S.P. Singh. 2006. Novel genetic variation in common bean from the Iberian Peninsula. *Crop Science*, 46, 2540-2546.
- Rogers, S.O., A.J. Bendich. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. In: Gelvin, S.B., R.A. Aschilperoff, D.P.S. Verma (Eds.). *Plant Molecular Biology Manual*: pp. 1-10. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Germany.
- Romani, A., P. Vignolini, C. Galardi, N. Mulinacci, S. Benedettelli, D. Heimler. 2004. Germoplasm characterization of Zolfino landraces (*Phaseolus vulgaris* L.) by flavonoid content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3838-3842.

Rosales Serna, R., J.A. Acosta Gallegos, J.S. Muruaga Martínez, J.M. Hernández Casillas, G. Esquivel Esquivel, P. Pérez Herrera. 2004. Variedades mejoradas de frijol del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Libro Técnico 6. SAGARPA-INIFAP-CIRCE, campo Experimental Valle de México. Chapingo, Estado de México, México.

Saghai-Marooof, M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgensen, R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance chromosomal location and population genetics. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 81, 8014-8018.

Sambrook J., E.F. Fritish, T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Vol 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Sanguinetti, C.J., E. Dias Neto, A.J.G. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17, 915-919.

Schuler, M.A., R.E. Zielinski. 1989. *Methods in plant molecular biology*. Academic Press. San Diego, California.

Scopes, K.R. 1994. *Protein Purification. Principles and Practice*. Springer. Los Angeles, USA.

Sehgal, D., V. R. Rajpal, S. N. Raina, T. Sasanuma, T. Sasakuma. 2009. Assaying polymorphism at DNA level for genetic diversity diagnostics of the safflower (*Carthamus tinctorius* L.) world germoplasm resources. *Genetica*, 135, 457-470.

Singh, S. P., R. Nodari, P. Gepts. 1991. Genetic diversity in cultivated common bean: I. Allozymes. *Crop Science*, 31, 19-23.

Simpson, J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 60, 73-76.

Soranzo N., J. Provan, W. Powell. 1999. An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. *Genome*, 42, 158-161.

Svetleva, D., G. Pereira, J. Carlier, L. Cabrita, J. Leitaõ, D. Genchev. 2006. Molecular characterization of *Phaseolus vulgaris* L genotypes included in Bulgarian collection by ISSR and AFLP analyses. *Scientia Horticulturae*, 109, 198-206.

Talai, S., S. Sen-Mandi. 2010. Seed vigor-related DNA marker in rice shows homology with acetyl CoA carboxylase gene. *Acta Oshysiologiae Plantarum*, 32, 153-167.

Tapas, A.R., D.M. Sakarkar, R.B. Kakde. 2008. Flavonoids and nutraceuticals: A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7, 1089-1099.

- Tibbits, W.N., T.L. White, G.R. Hodge, N.M.G. Borralho. 2006. Genetic variation in frost resistance of *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* assessed by artificial freezing in winter. *Australian Journal of Botany*, 4, 521-529.
- Tucker, C.L., J. Harding, 1975. Outcrossing in common bean *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of American Society of Horticulture Science*, 100, 283-285.
- Vanderlip, R.L., F.E. Mockel, H. Jan. 1973. Evaluation vigor test for sorghum seed. *Agronomy Journal*, 65, 486-488.
- Vargas-Vázquez, M.L.P., J.S. Muruaga-Martínez, P. Pérez-Herrera, O.H. Gill-Langarica, G. Esquivel-Esquivel, M.A. Martínez-Damián, R. Rosales-Serna, N. Mayek-Pérez. 2008. Morphoagronomic characterization of the INIFAP collection of the cultivated form of common bean. *Agrociencia*, 42, 787-797.
- Vázquez-Domínguez, E., S. Castañeda-Rico, T. Garrido-Garduño, T.A. Gutiérrez-García. 2009. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista Chilena de Historia Natural*, 82, 277-297.
- Veit M, Beckert C, Höhne C, Bauer K, Geiger H. 1995. Interspecific and intraspecific variation of phenolics in the genus *Equisetum* subgenus *Equisetum*. *Phytochemistry*, 38, 881-891.
- Velicevici, G., E. Madosa, R. Sumalan, S. Ciulca, S. Popescu, C. petolescu. 2012. The use of RAPD and ISSR markers for genetic diversity among some barley cultivars. *Romanian Biotechnological Letters*, 17, 7493-7503.
- Vendramin, G.G., L. Lelli, P. Rossy, M. Morgante. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology*, 5, 595-598.
- Vendramin, G.G., M. Anzide, Madaghiele, G. Bucci. 1998. Distribution of genetic diversity in *Pinus pinaster* Ait. as revealed by chloroplast microsatellites. *Theoretical Applied Genetic*, 97, 456-463.
- Vidal-Barahona, A., L.C. Lagunes-Espinoza, E. Valadez Moctezuma, C.F. Ortiz-García. 2006. Morphological and molecular variability among native and commercial cultivars of black bean in Tabasco, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29, 273-281.
- Weber L., C. Wong. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, 2, 1123-1128.
- Wells, W.C., W.H. Isom, J.G. Waines, 1988. Outcrossing rates of six common bean lines. *Crop Science*, 28, 177-178.

Wiessenbach, J., G. Gyapay, C. Dib, A. Vignal, J. Morissette, P. Millasseau, G. Vaysseix, M. Lathrop. 1992. A second-generation link-age map of the human genome. *Nature*, 359, 794-801.

Wolfe, D.A., A. Liston. 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: Soltis, D.E., P.S. Soltis, J.J. Doyle (Eds.). *Molecular Systematics of Plant II*: pp. 43-86. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, USA.

Wolfe, A.D., Q.Y. Xiang and S.R. Kephart, 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) bands. *Molecular Ecology*, 7, 1107-1125.

Yang, J., J. Guo, J. Yuan. 2008. In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1060-1066.

Yeh F., Yang R.C. and Boyle T.J. 1999. Popgene version 1.32. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Edmonton, Canada.

Yu, K., S.J. Park, V. Poysa, P. Gepts. 2000. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Hereditas*, 91, 429-434.

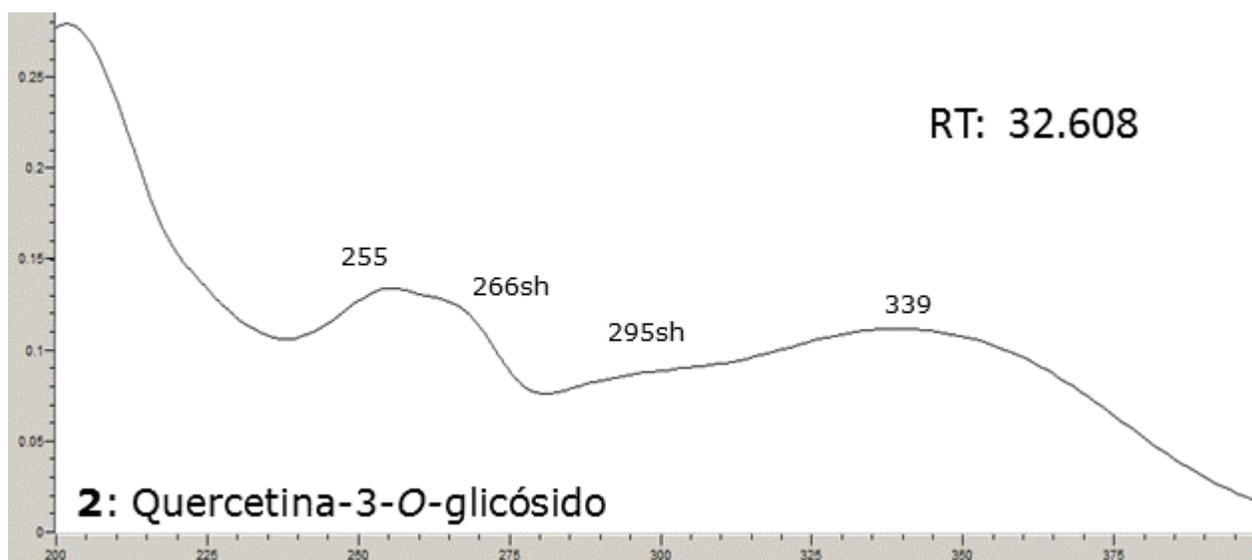
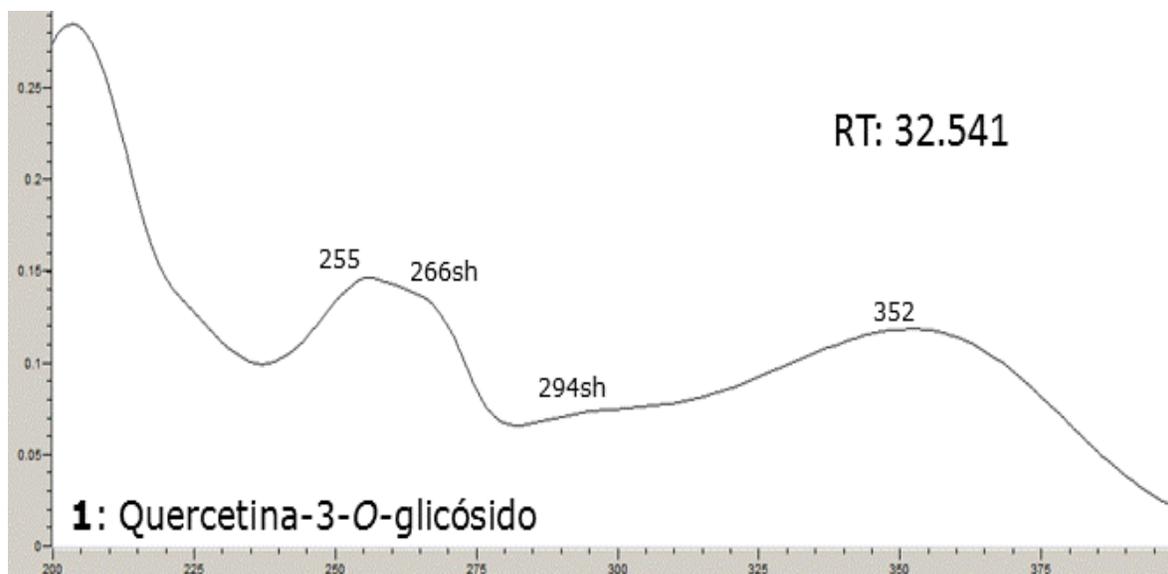
Zietkiewicz E., A. Rafalski, D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176-183.

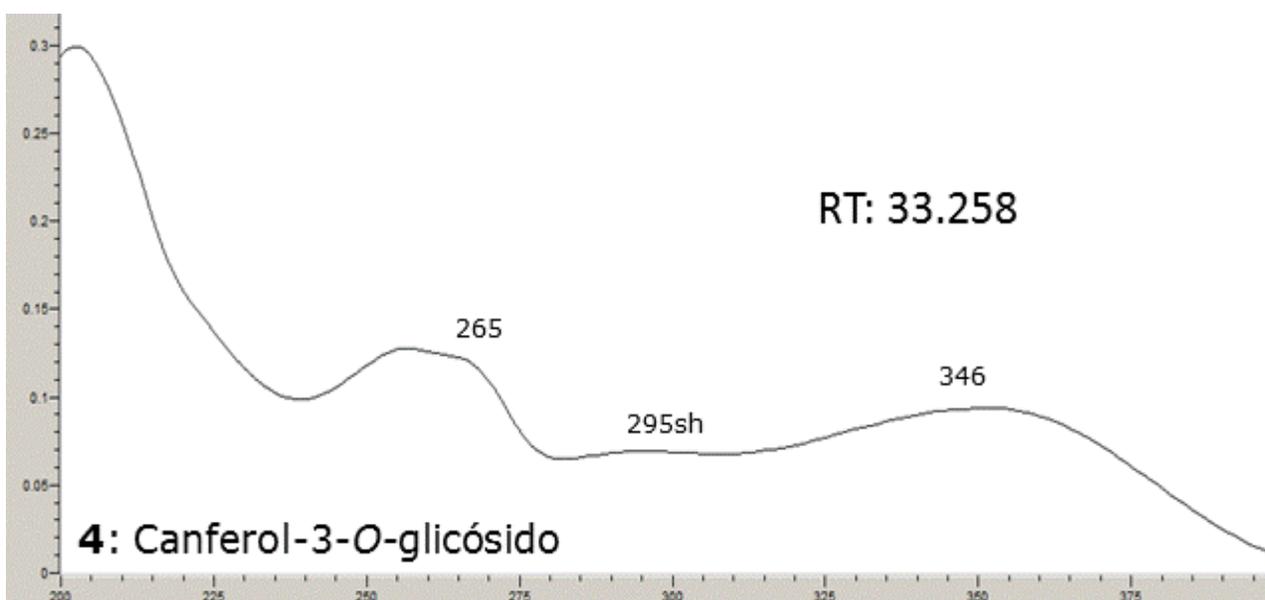
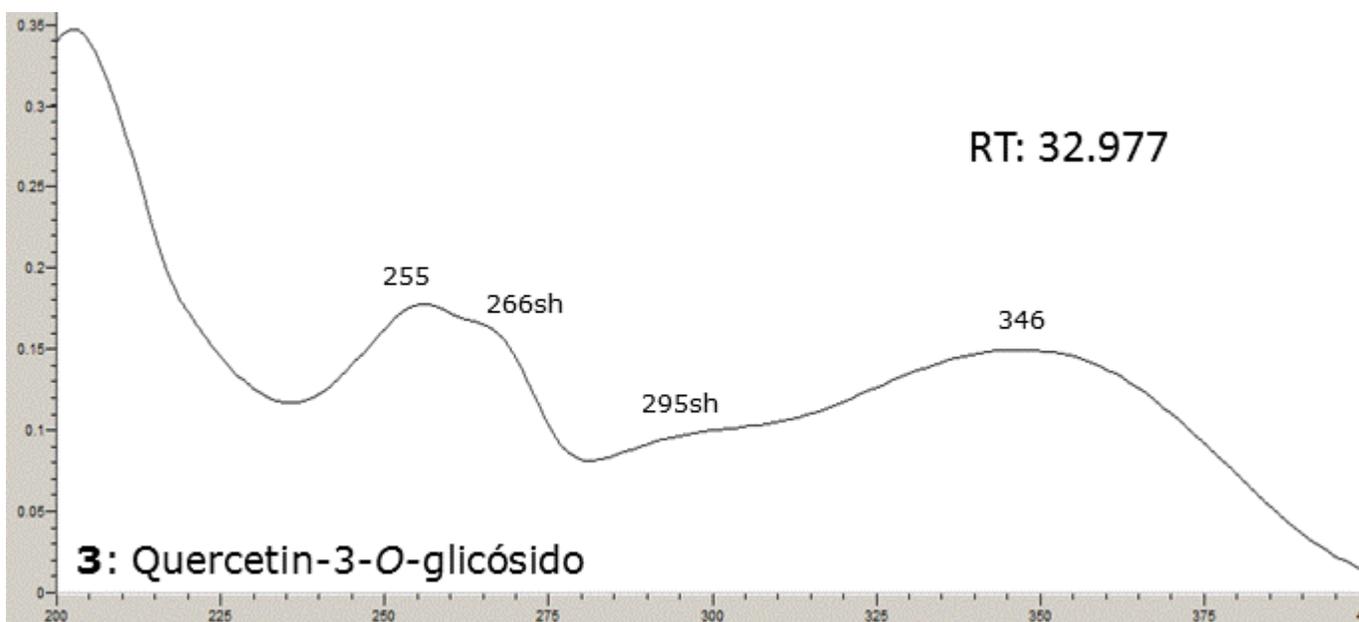
9. Anexos

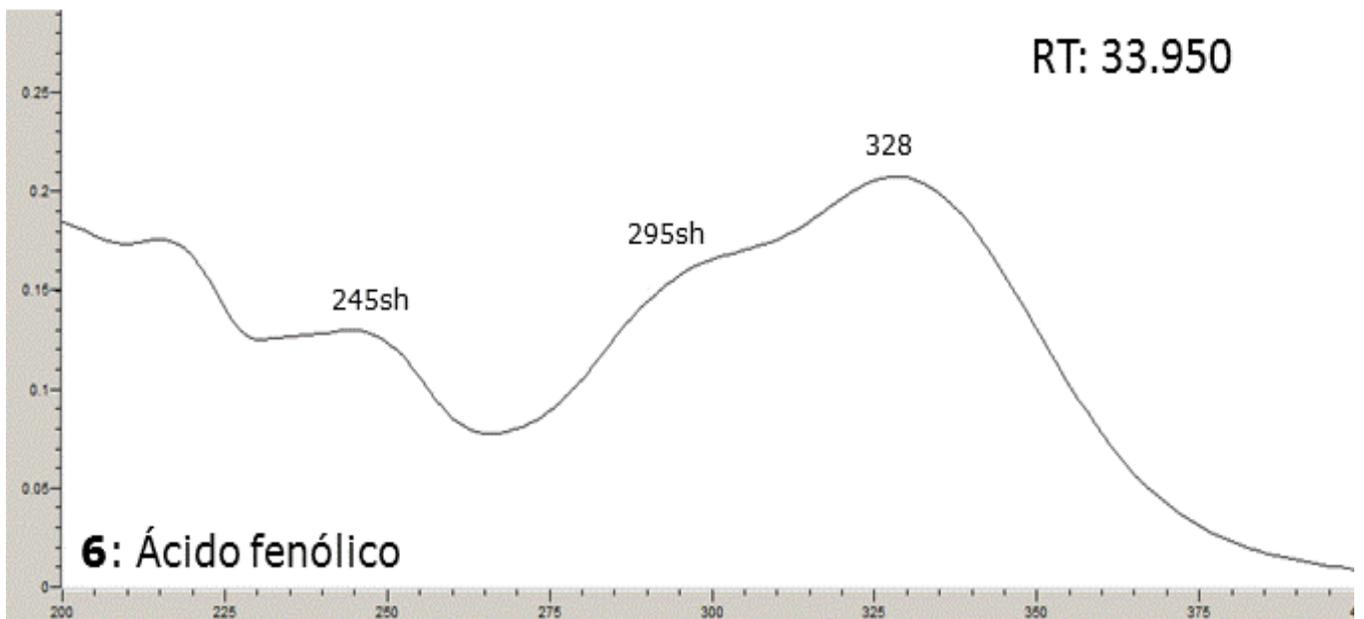
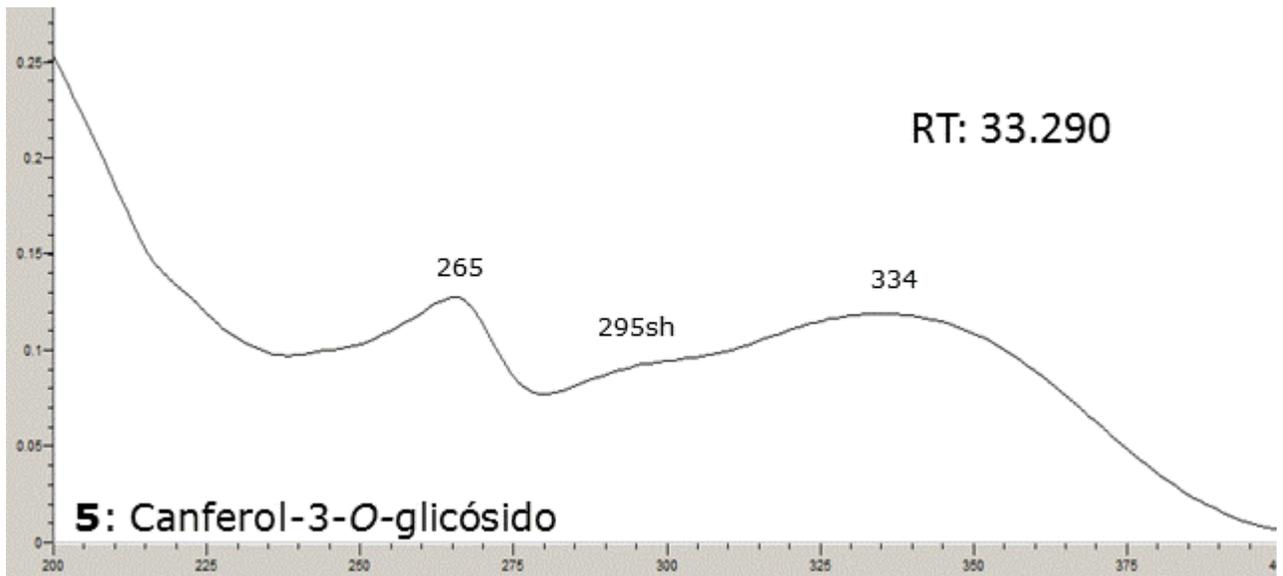
Anexo 1. Intervalo de valores de A_{260} , A_{280} , A_{260}/A_{280} , y de concentración de ADN para 36 muestras de *Phaseolus*.

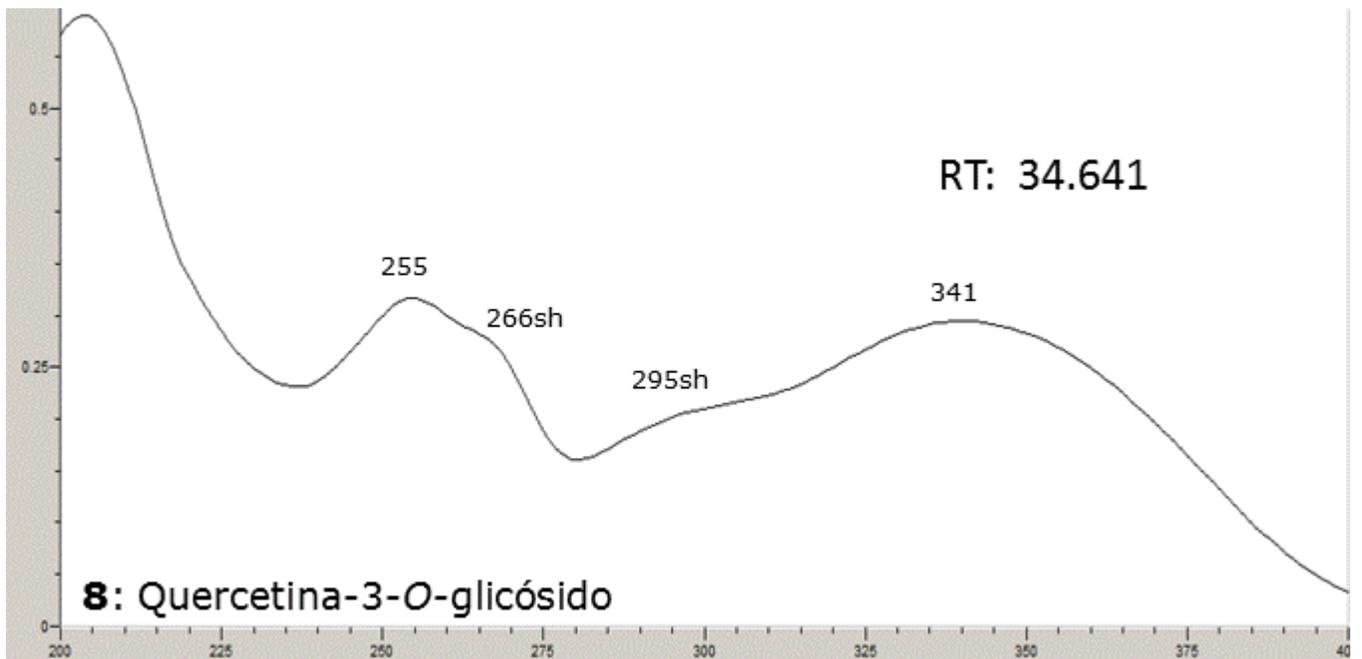
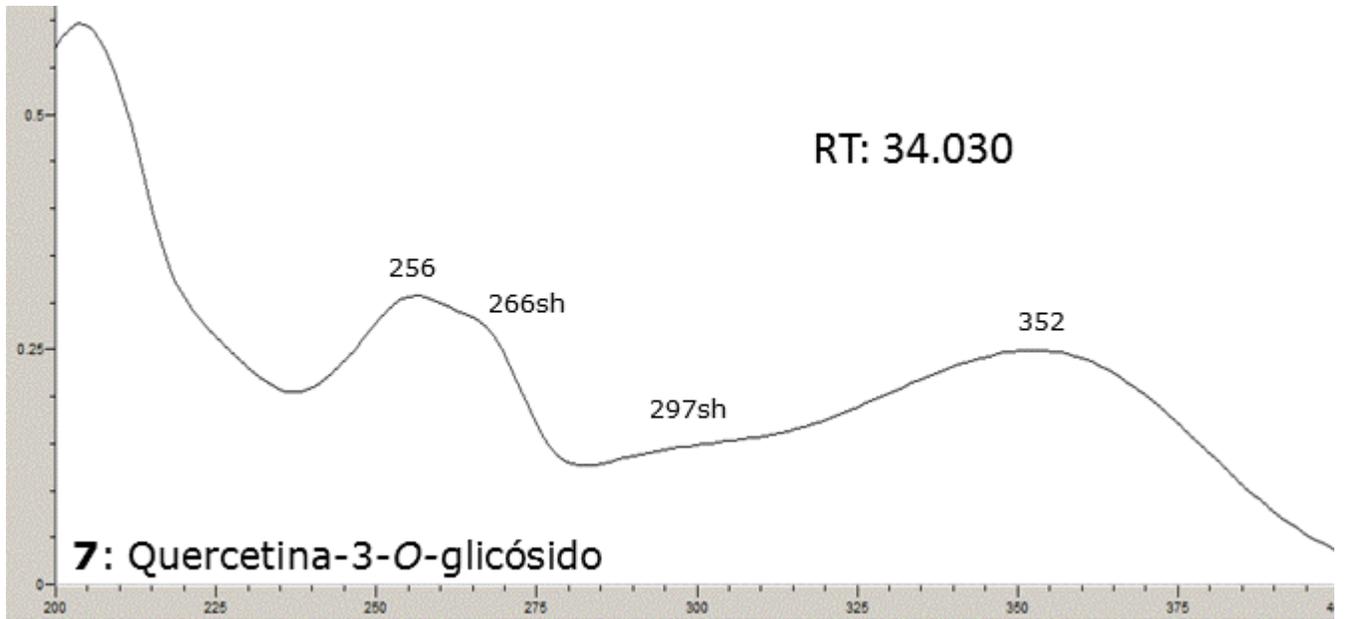
Número de muestra	Muestra	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{260nm}/A_{280nm}	Concentración (ng/mL)
1	Negro Zacatecas	0.017 - 0.318	0.008 - 0.188	0.900 - 5.265	212.5 – 3975
2	Negro San Luis	0.026 - 0.850	0.020 - 0.070	1.300 - 12.143	325 – 10625
3	Negro Altiplano	0.030 - 0.284	0.026 - 0.183	1.154 - 1.552	375 – 3550
4	Negro Vizcaya	0.015 - 0.722	0.009 - 0.391	1.667 - 1.847	187.5 – 9025
5	Negro V.8025	0.023 - 0.341	0.019 - 0.216	1.211 - 1.579	287.5 - 4262.5
6	Negro Frijozac 101	0.088 - 0.573	0.066 - 0.312	1.333 - 1.837	1100 - 7162.5
7	Pinto Mestizo	0.032 - 0.351	0.016 - 0.198	1.203 - 2.100	400 - 4387.5
8	Pinto Saltillo	0.029 - 1.065	0.024 - 0.553	1.208 - 1.926	362.5 - 13312.5
9	Canario Regional	0.009 - 0.469	0.005 - 0.241	1.176 - 2.029	112.5 - 5862.5
10	Azufrado Namiquipa	0.036 - 0.230	0.015 - 0.140	1.154 - 2.467	450 – 2875
11	Azufrado Higuera	0.010 - 0.145	0.002 - 0.111	1.000 - 5.000	125 - 1812.5
12	Flor De Mayo M-38	0.013 - 0.156	0.006 - 0.120	1.077 - 2.167	165.5 – 1950
13	Azufrado Pimono 78	0.008 - 0.338	0.007 - 0.177	1.000 - 2.143	100 – 4225
14	Río Grande Querétaro	0.033 - 0.795	0.016 - 0.419	1.316 - 2.245	412.5 - 9937.5
15	Pinto Libertad	0.011 - 0.364	0.002 - 0.318	1.106 - 5.500	137.5 – 4550
16	Vaquita	0.023 - 0.563	0.015 - 0.285	1.533 - 2.020	287.5 - 7037.5
17	Pinto Bravo	0.017 - 0.195	0.012 - 0.113	1.160 - 1.917	212.5 - 2437.5
18	Pinto Centenario	0.020 - 0.406	0.010 - 0.236	1.138 - 2.000	250 – 5075
19	Pinto Coloso	0.029 - 1.056	0.017 - 0.563	1.121 - 1.894	362.5 – 13200
20	Pinto Durango	0.047 - 0.799	0.027 - 0.416	1.389 - 1.921	587.5 - 9987.5
21	Pinto Bayacora	0.049 - 0.786	0.029 - 0.423	1.170 - 1.905	612.5 – 9825
22	Pinto Villa	0.015 - 1.486	0.010 - 0.763	1.500 - 1.966	187.5 – 18575
23	Flor De Mayo Sol	0.002 - 0.293	0.002 - 0.251	0.667 - 2.235	25 - 3662.5
24	Flor De Junio Ana	0.012 - 0.146	0.007 - 0.121	0.882 - 2.778	150 – 1825
25	Flor De Junio Marcela	0.022 - 0.112	0.017 - 0.100	1.048 - 1.538	275 – 1400
26	Bayo Madero	0.024 - 0.393	0.019 - 0.248	1.152 - 1.929	300 - 4912.5
27	Bayo Victoria	0.126 - 0.950	0.071 - 0.509	1.114 - 1.895	1575 – 11875
28	F.M.2000	0.051 - 0.953	0.035 - 0.514	1.457 - 1.969	637.5 - 11912.5
29	Pinto Centauro	0.081 - 0.896	0.040 - 0.482	1.419 - 2.025	1012.5 – 11200
30	Negro Plus Sinaloa	0.049 - 0.619	0.030 - 0.367	1.366 - 1.697	612.5 - 7737.5
31	Pinto Saltillo Sinaloa	0.009 - 0.122	0.002 - 0.077	1.162 - 5.000	112.5 – 1525
32	Azufrado Higuera Sinaloa	0.012 - 0.151	0.005 - 0.124	1.218 - 3.000	150 - 1887.5
33	<i>Phaseolus coccineus</i>	0.035 - 0.331	0.022 - 0.188	1.491 - 2.455	437.5 - 4137.5
34	Silvestre Negro	0.245 - 1.070	0.152 - 0.630	1.418 - 1.698	3062.5 – 13375
35	Silvestre Café	0.360 - 0.611	0.223 - 0.368	1.614 - 1.672	4500 - 7637.5
36	Silvestre Amarillo	0.047 - 0.783	0.036 - 0.443	1.270 - 1.794	587.5 - 9787.5

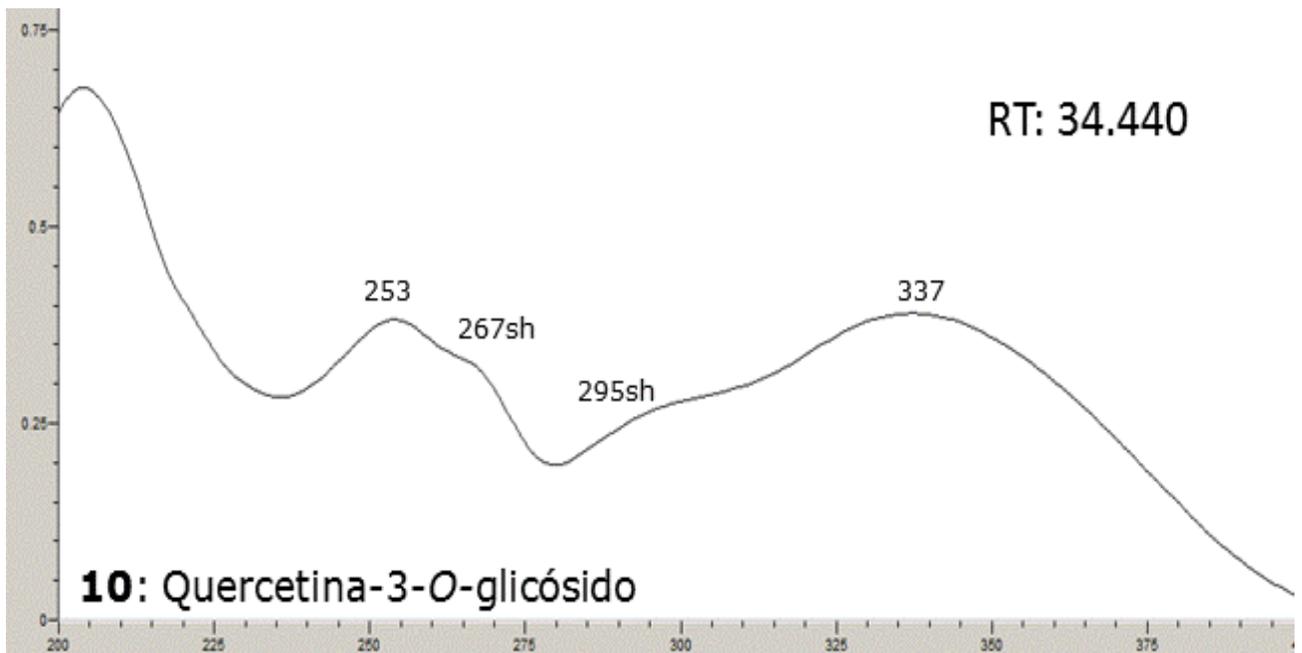
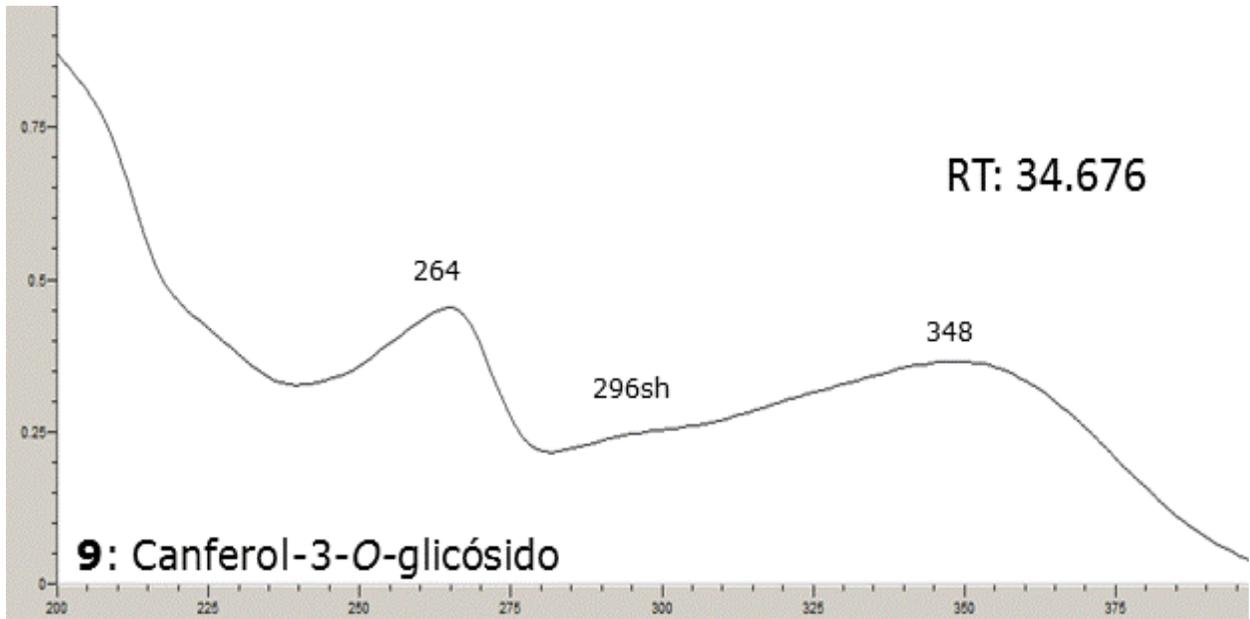
Anexo 2. Espectros UV de los compuesto fenólicos presentes en los tejidos foliares de las muestras de *Phaseolus*.

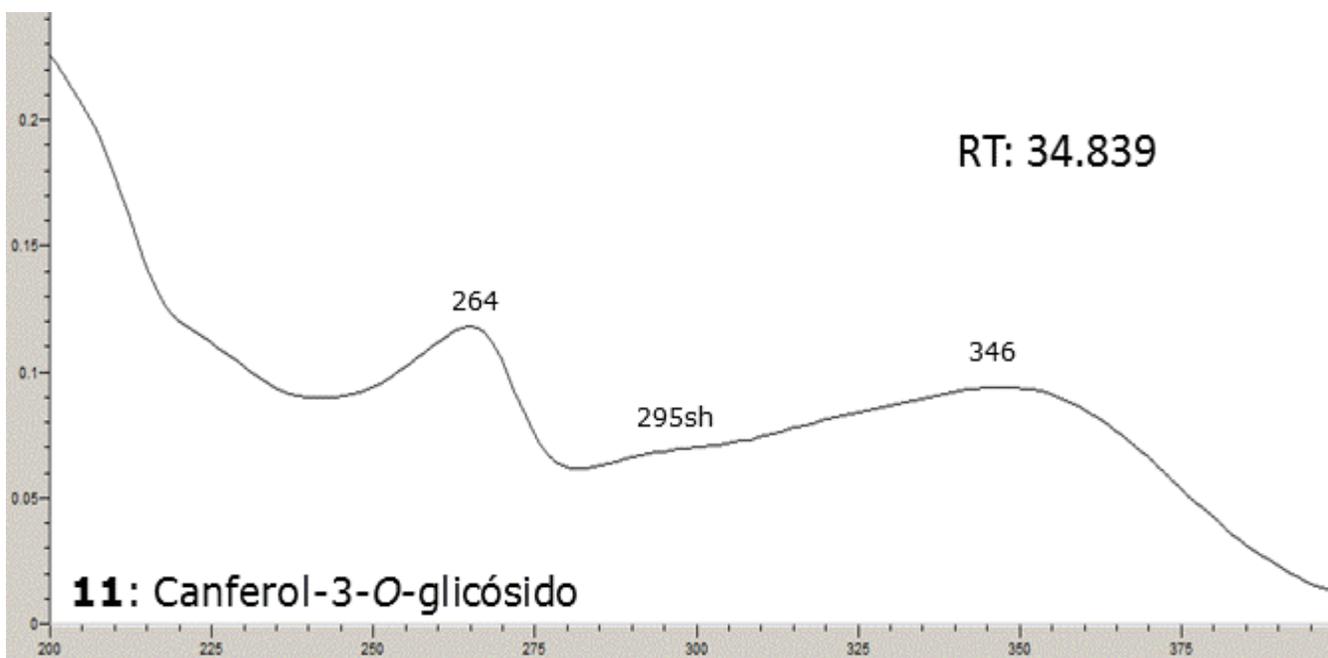


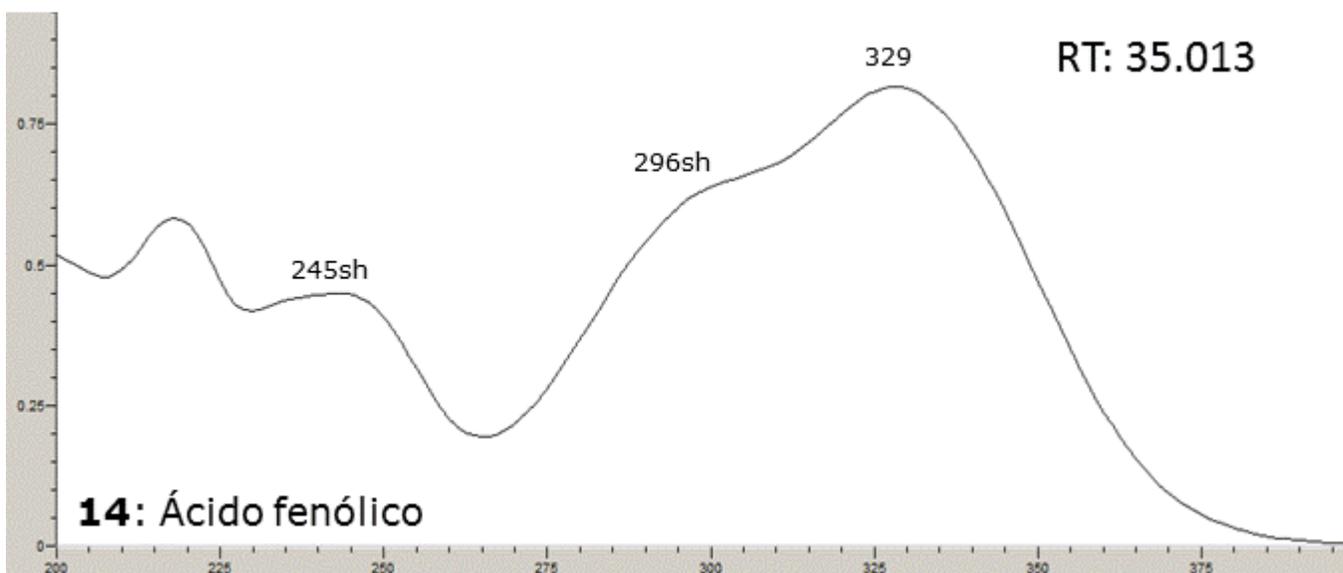
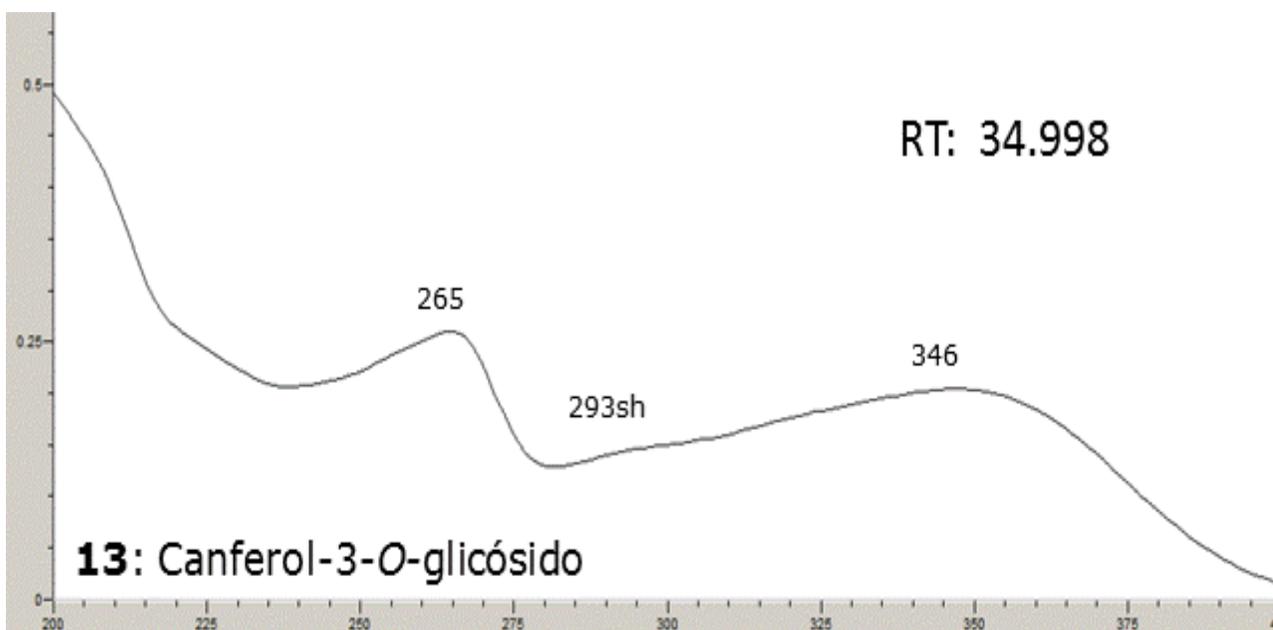


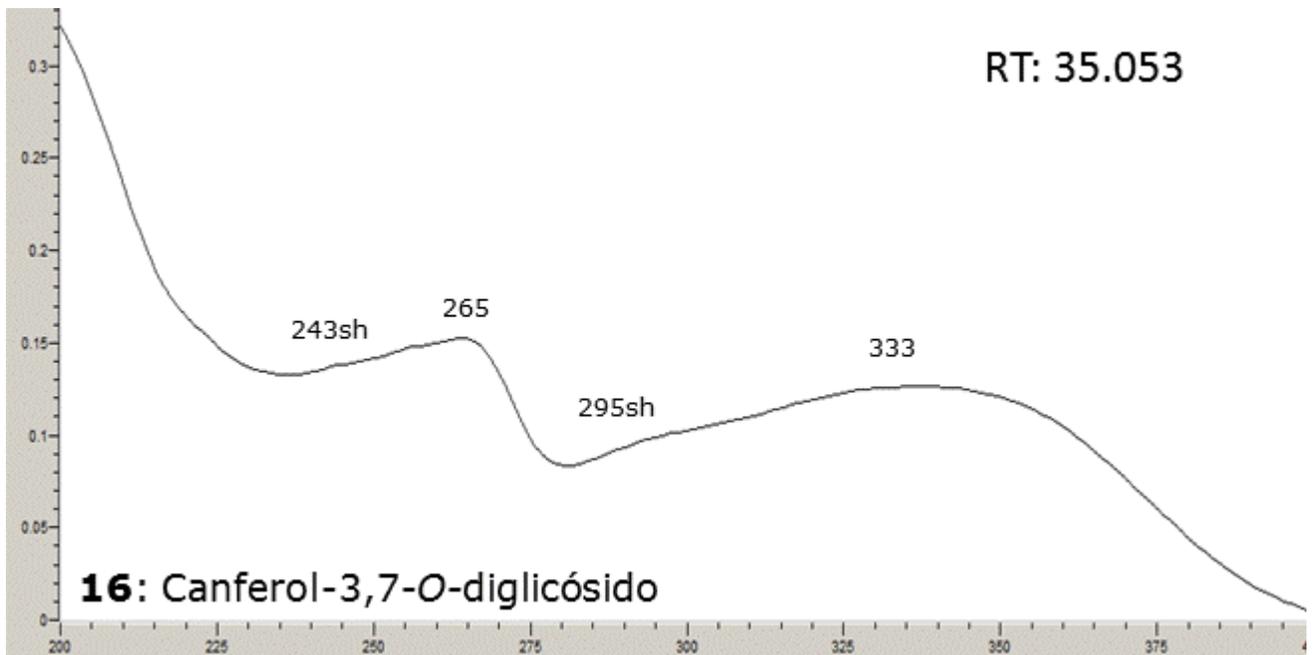
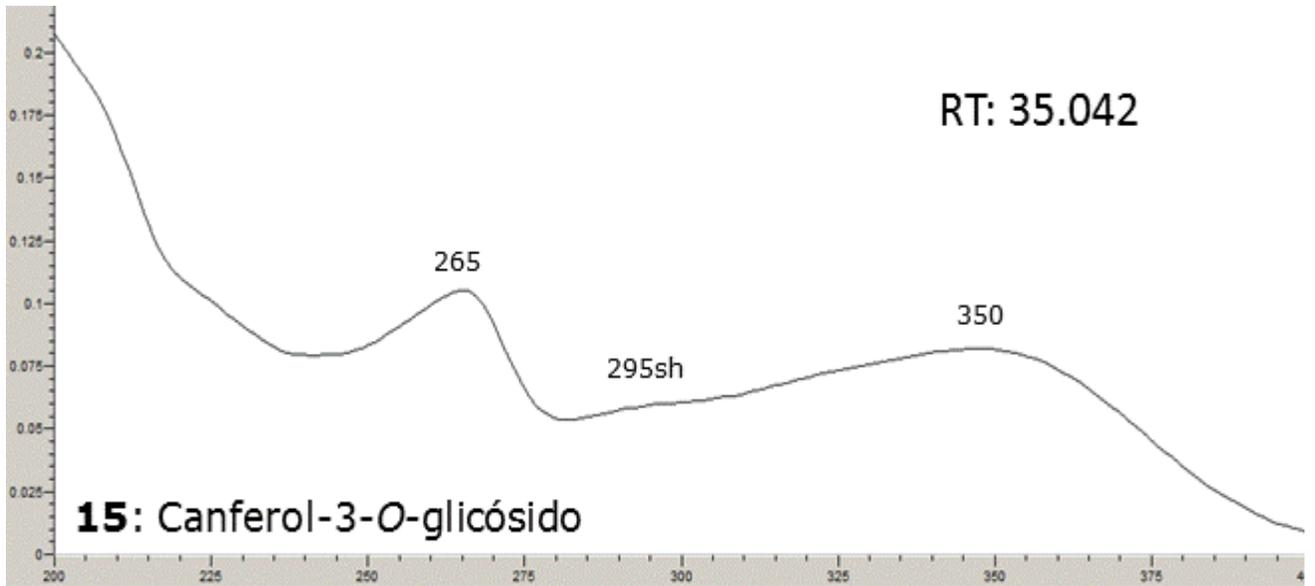


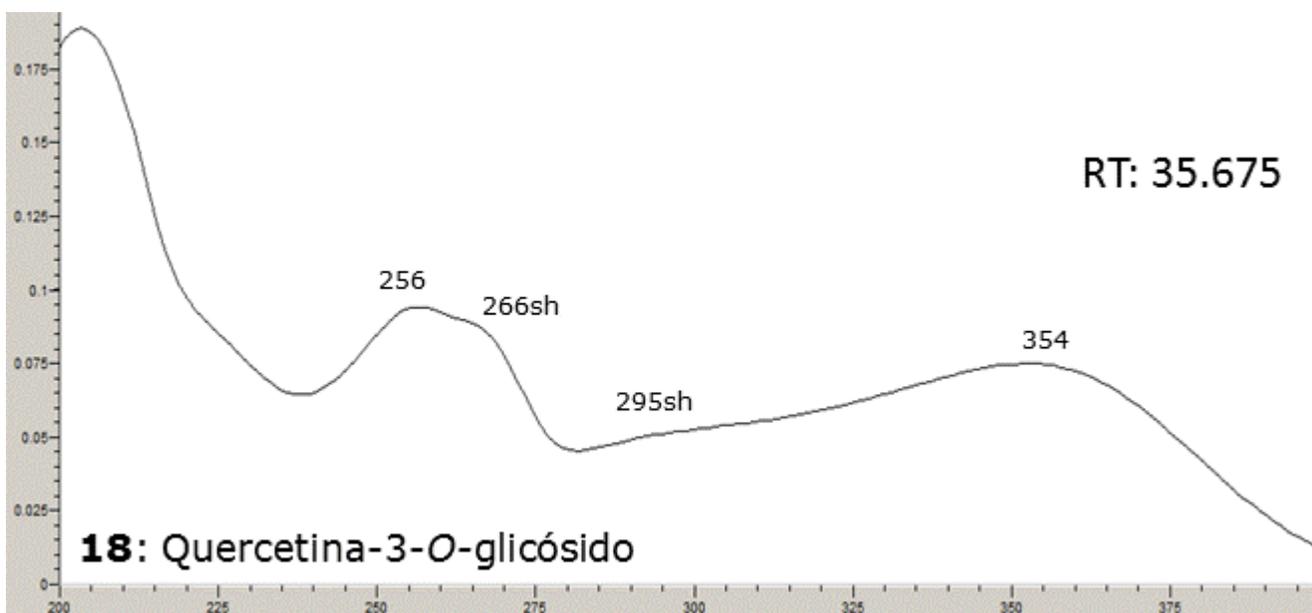
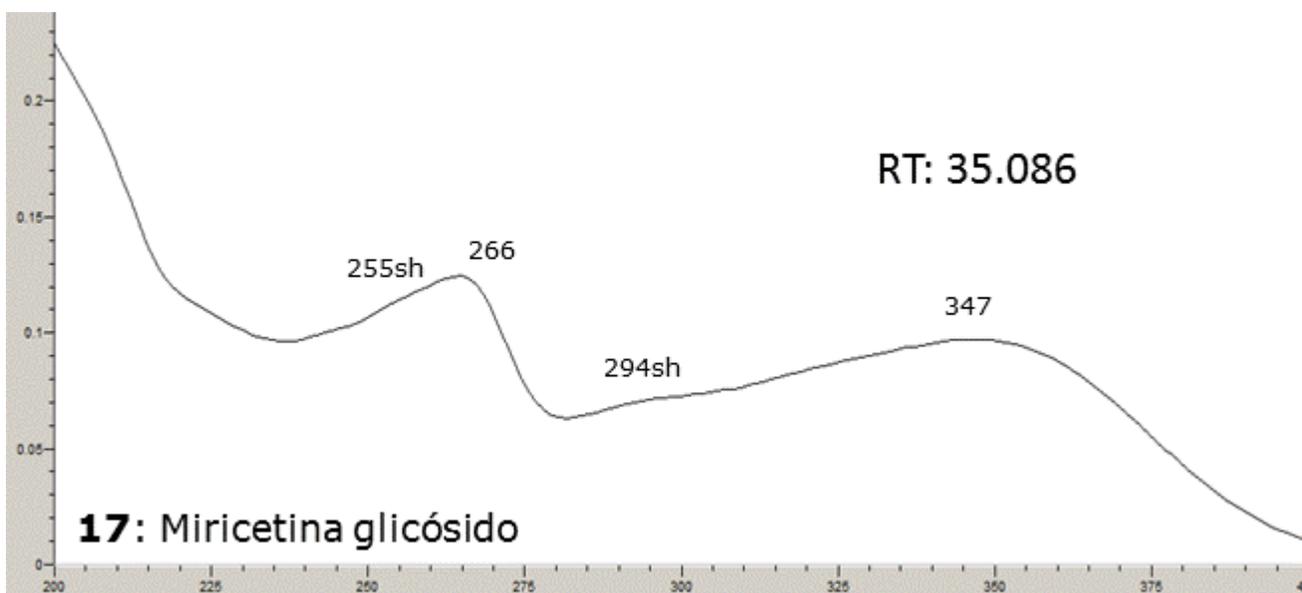


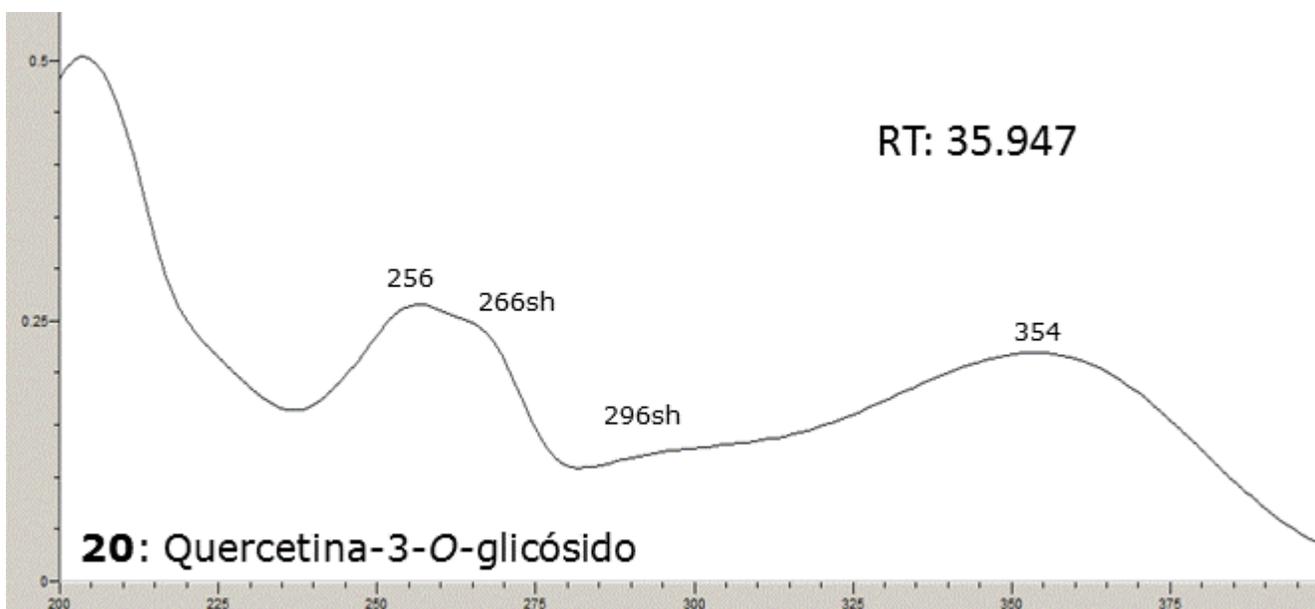
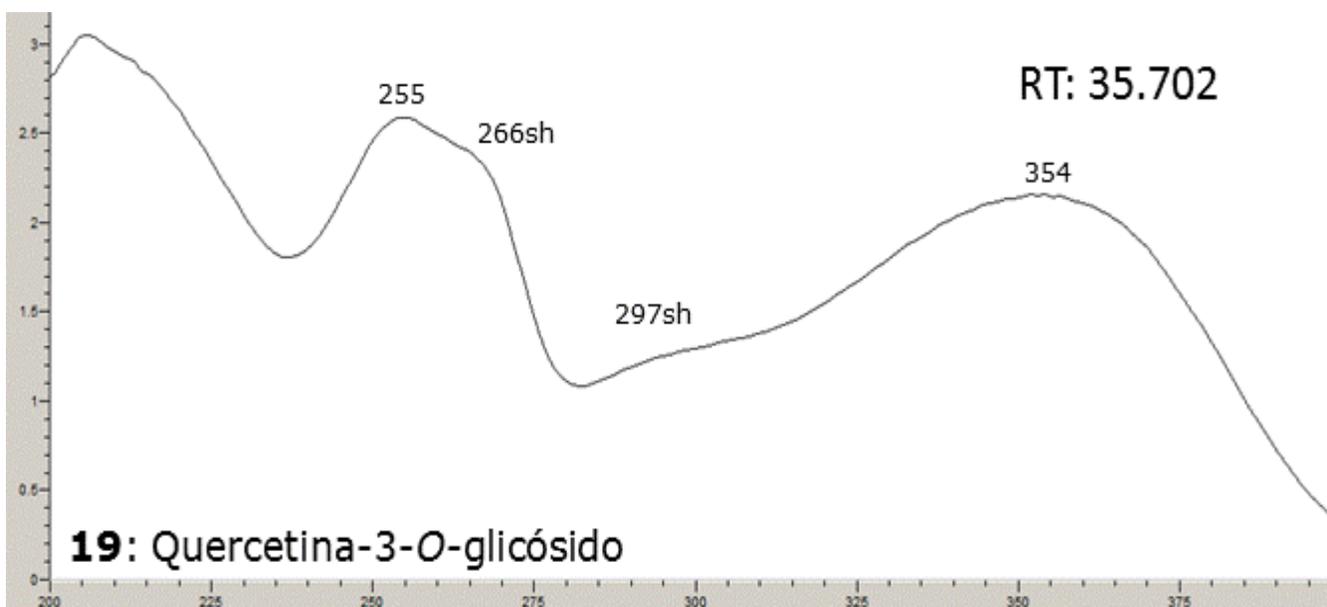


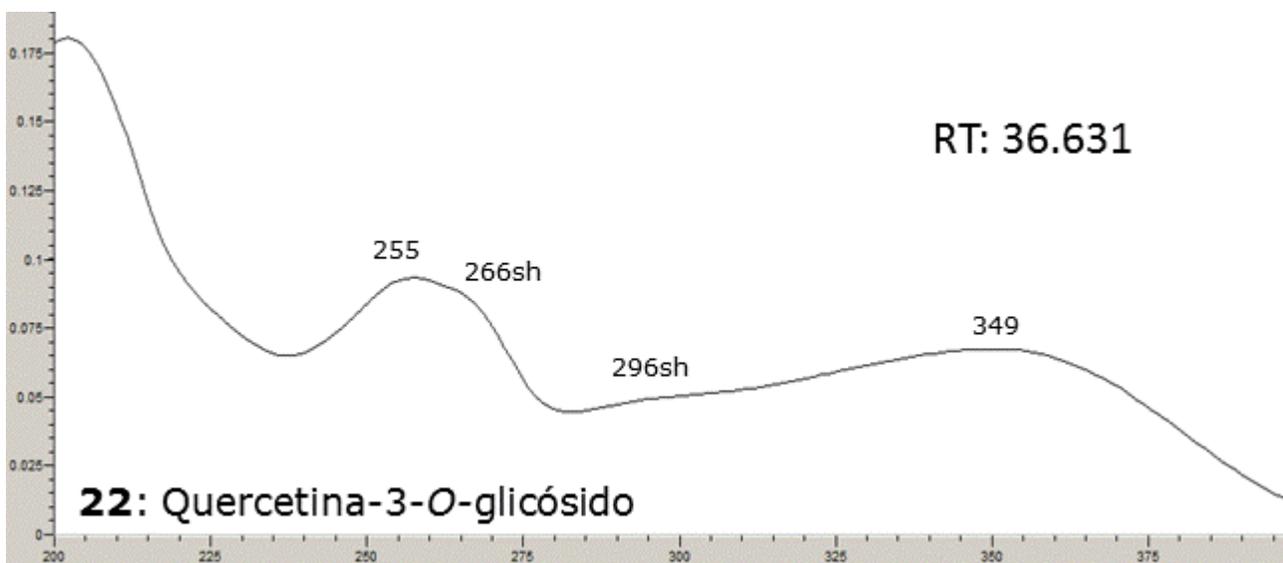
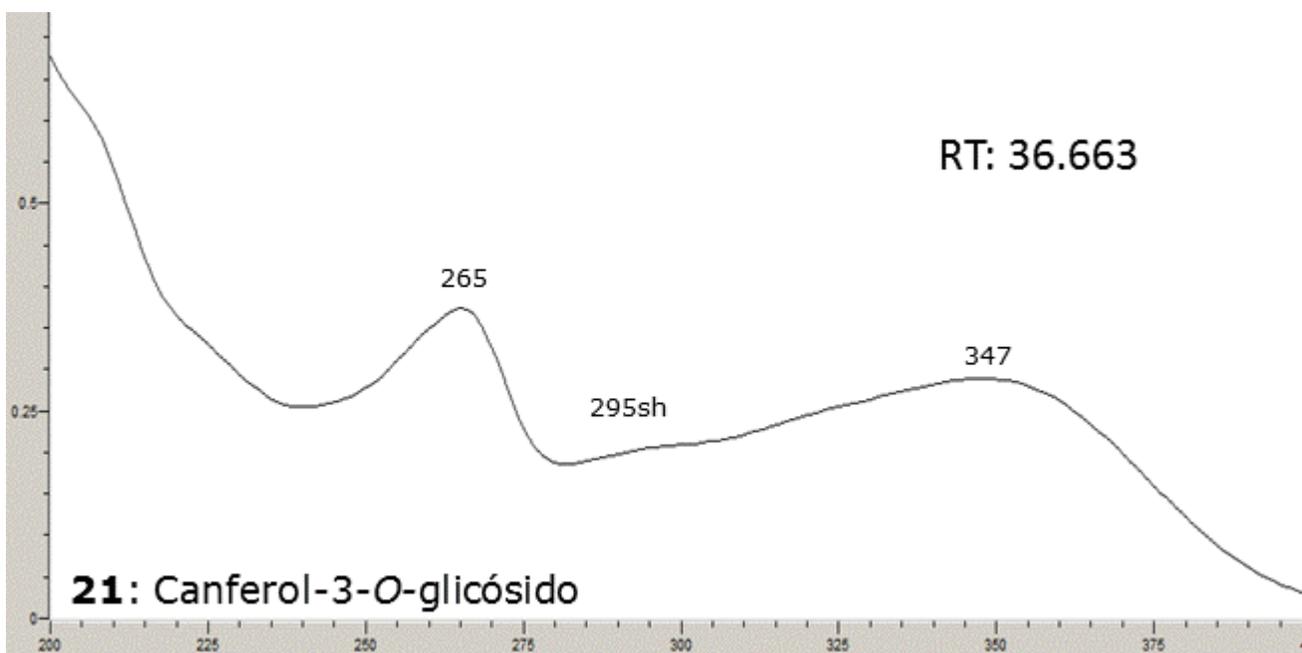


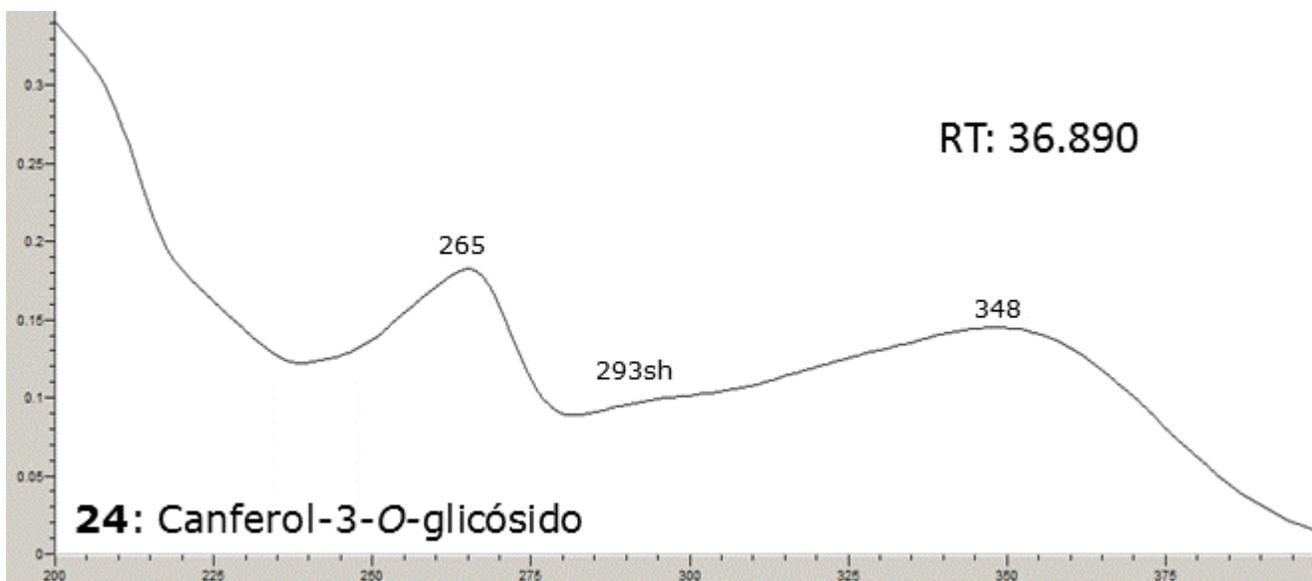
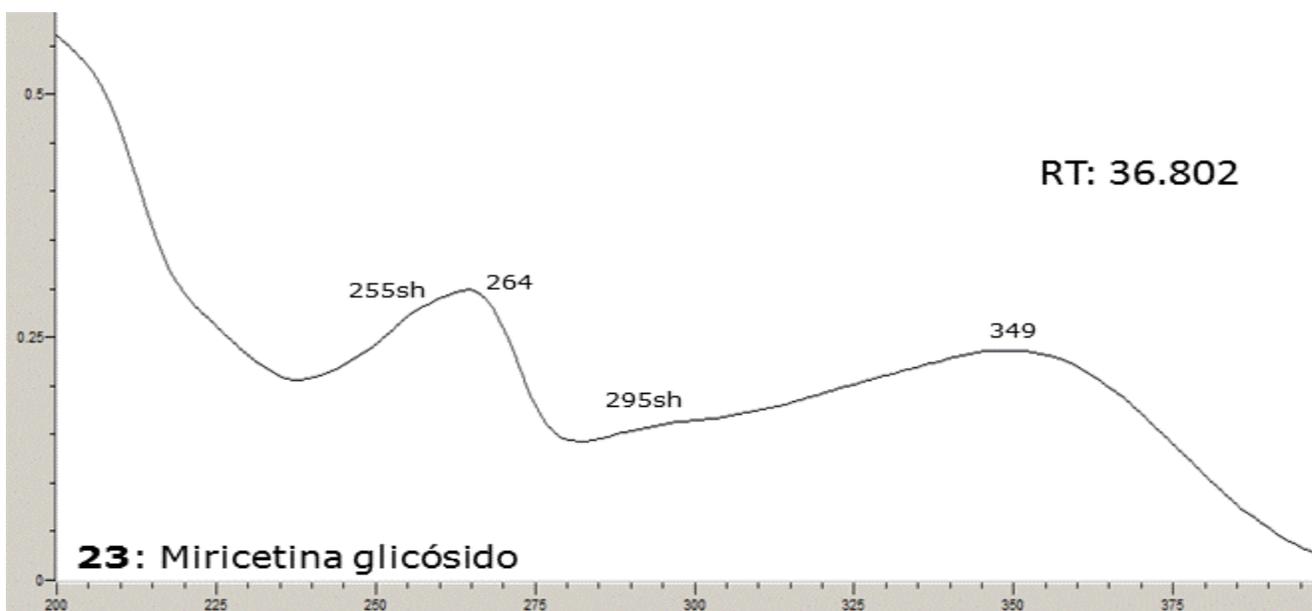


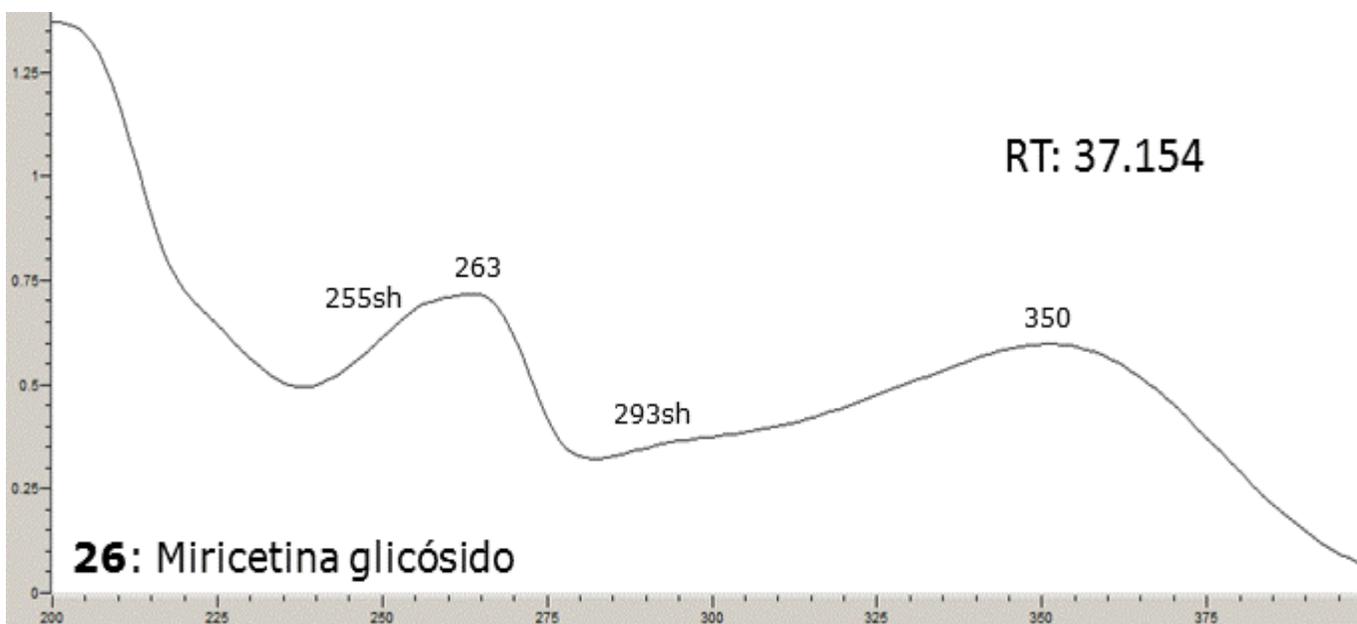
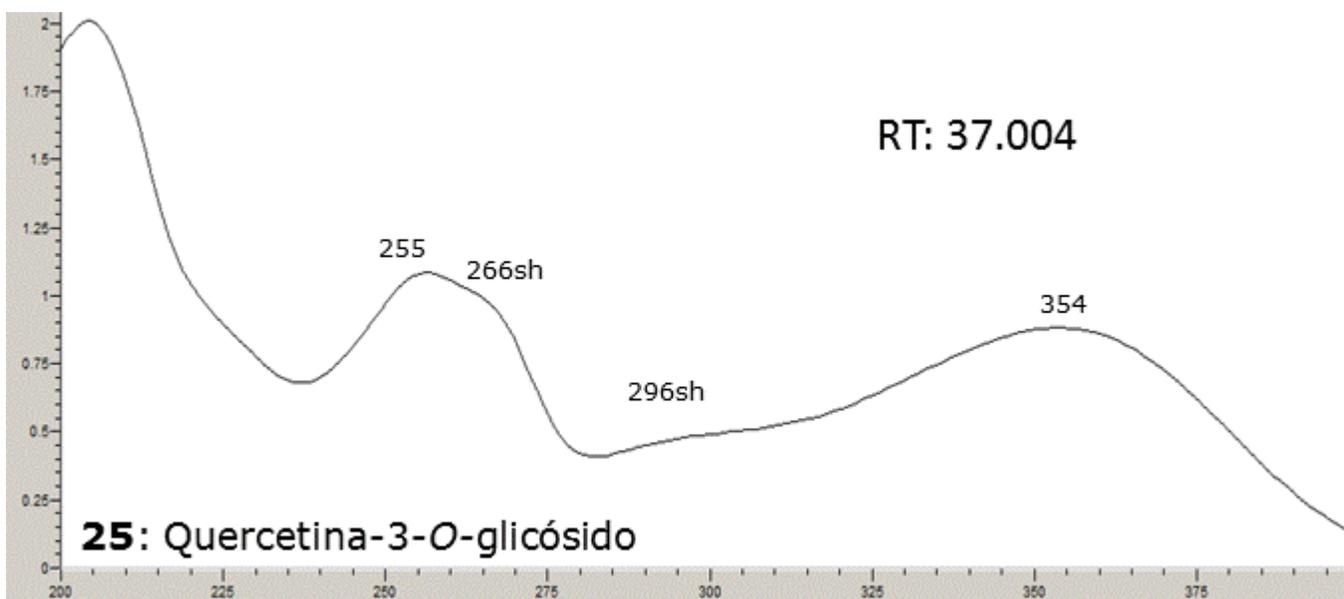


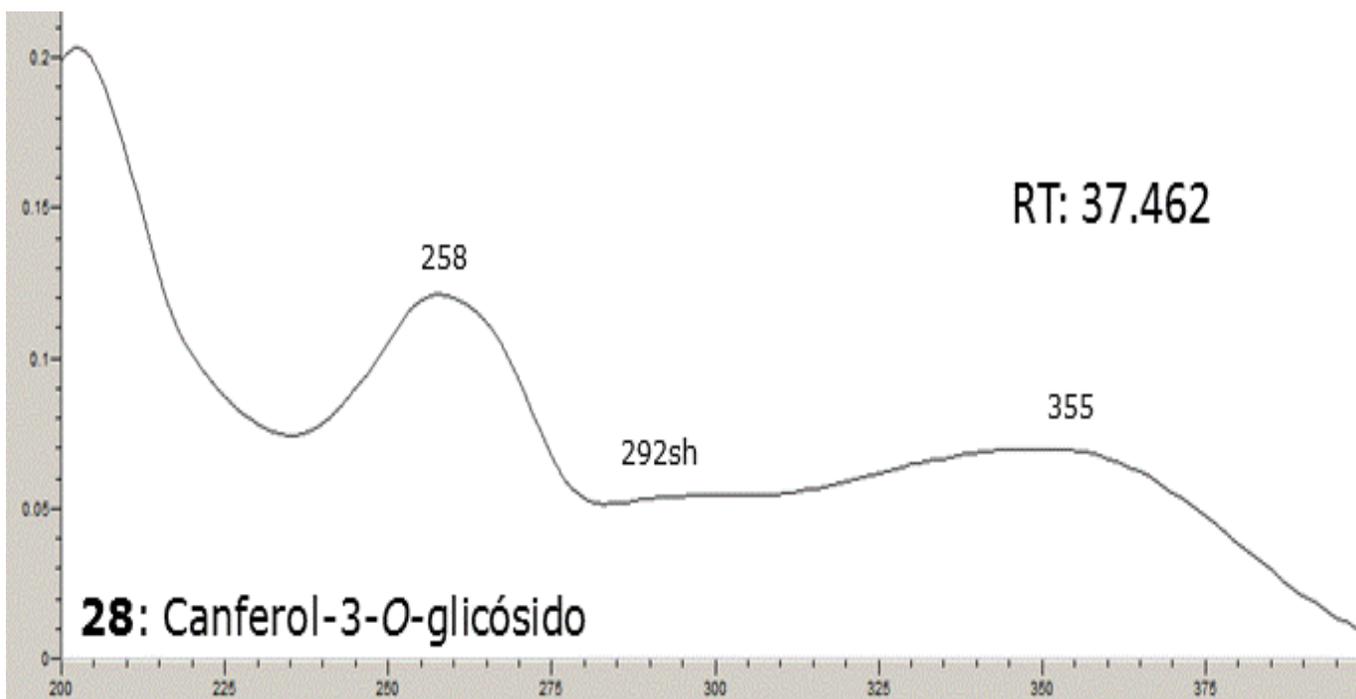
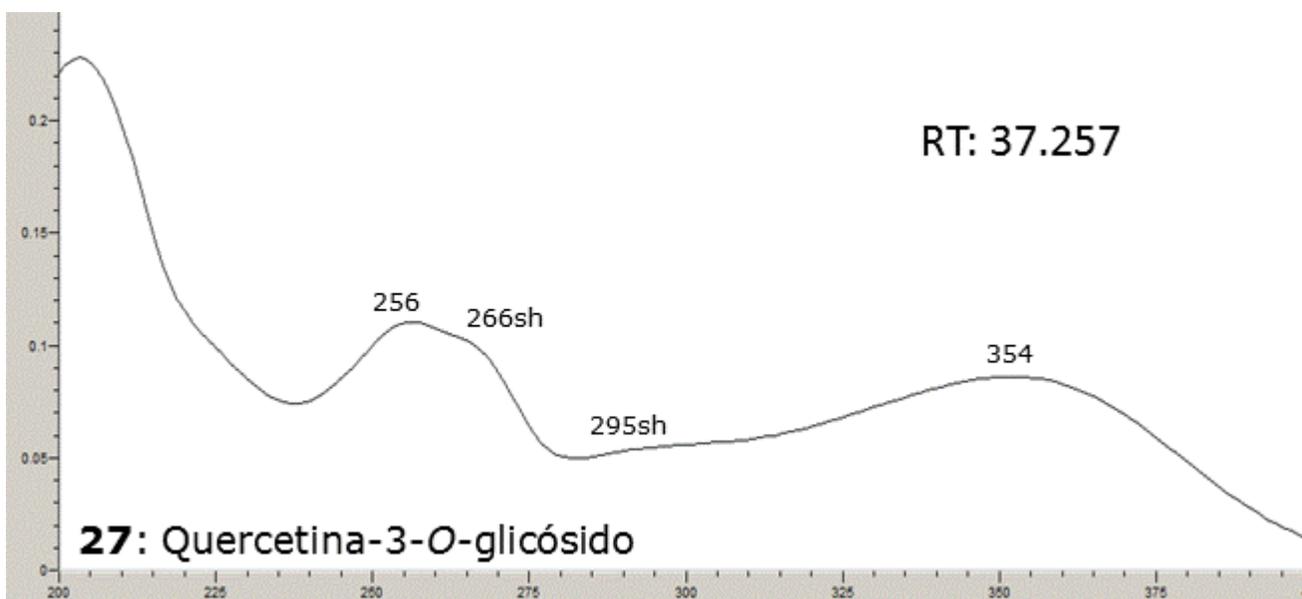


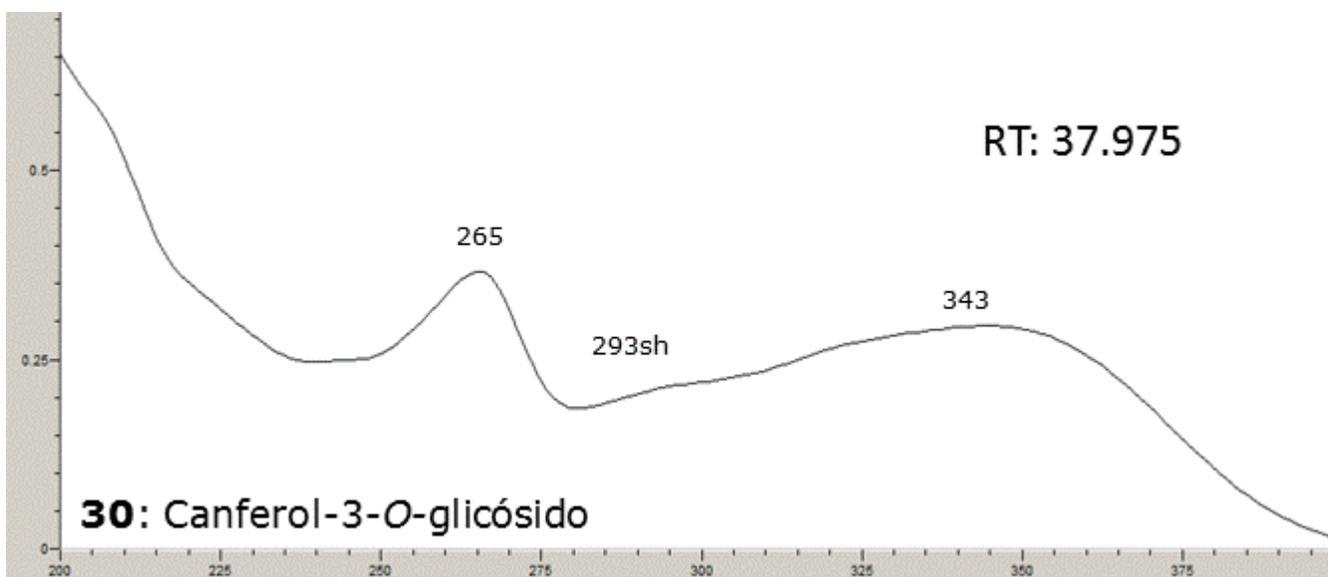
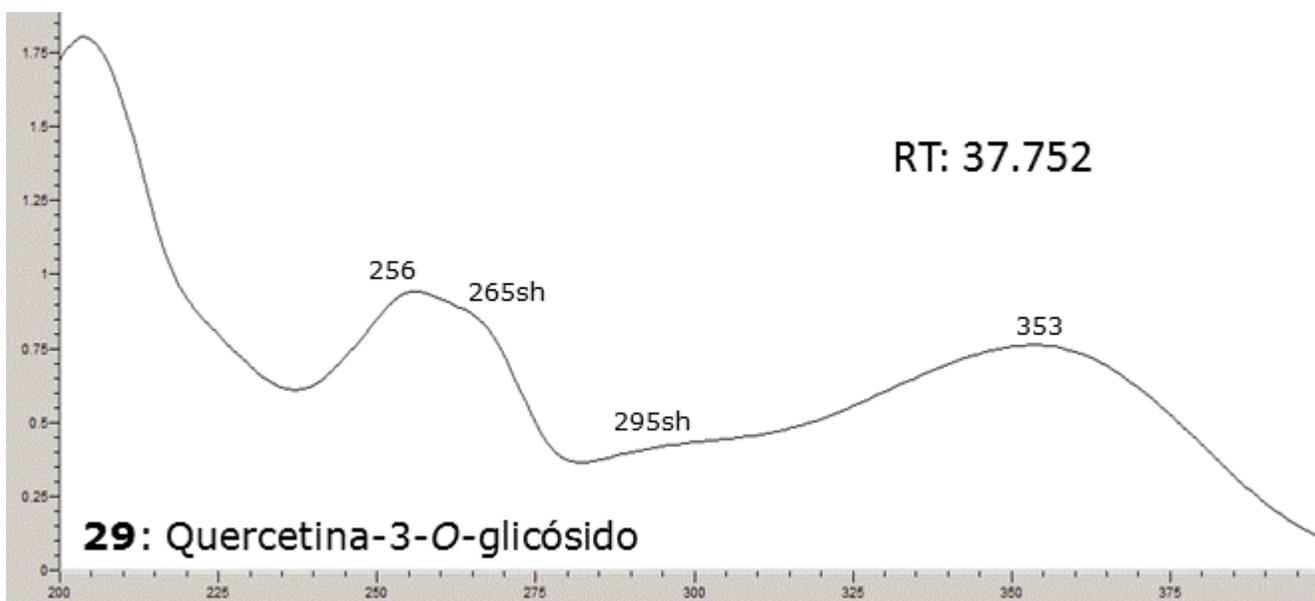


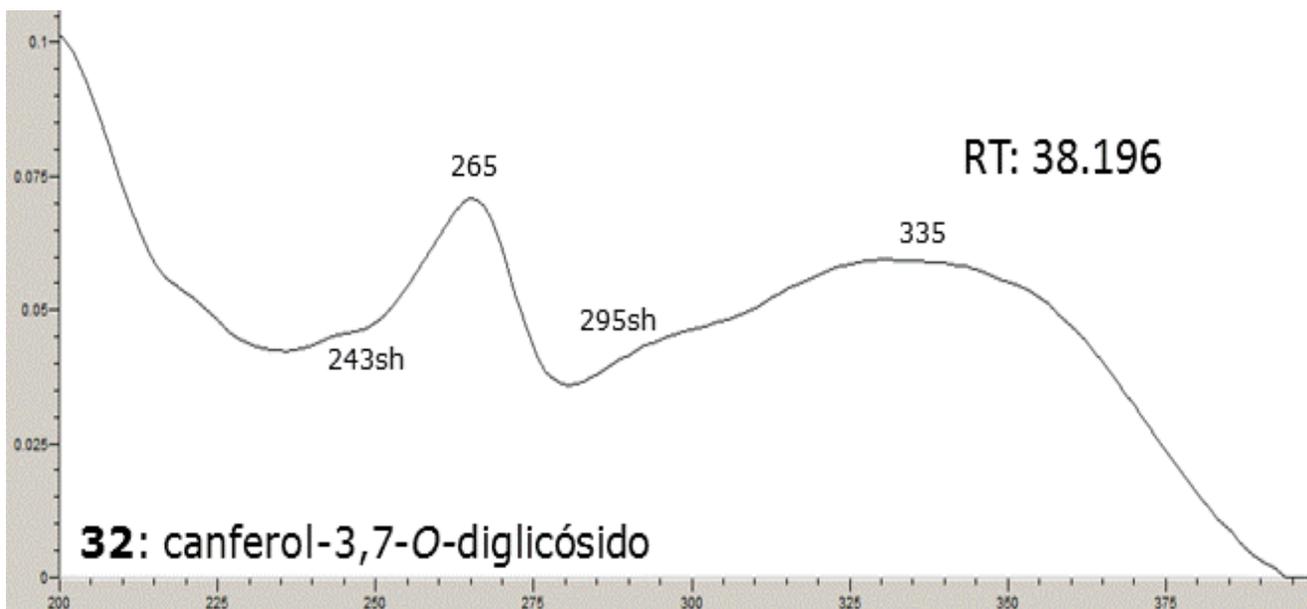
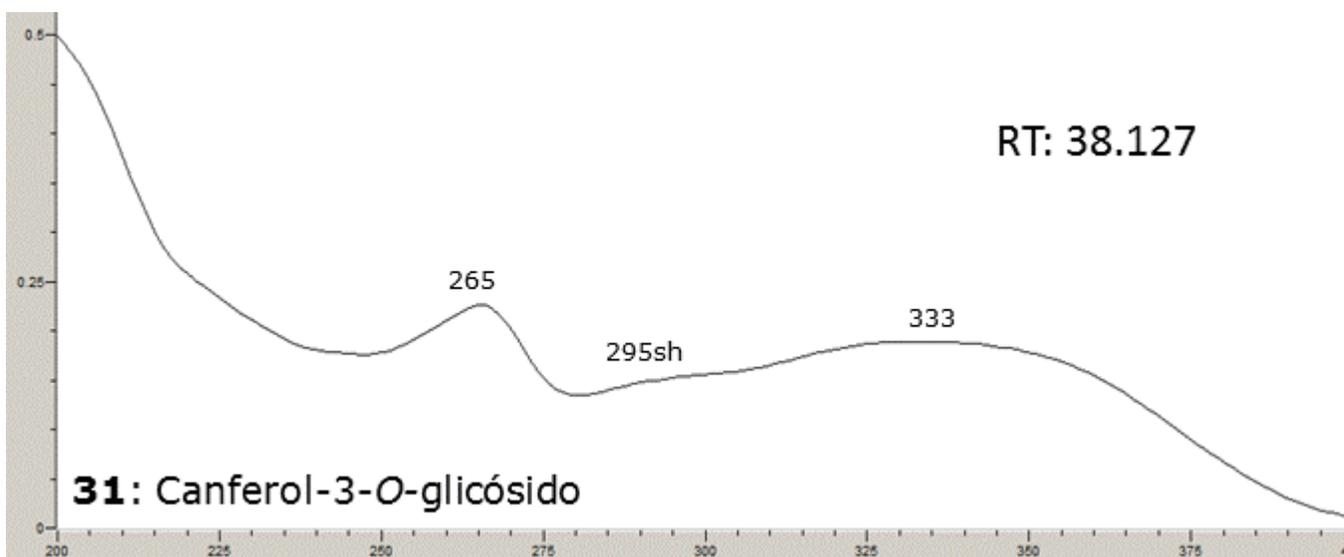


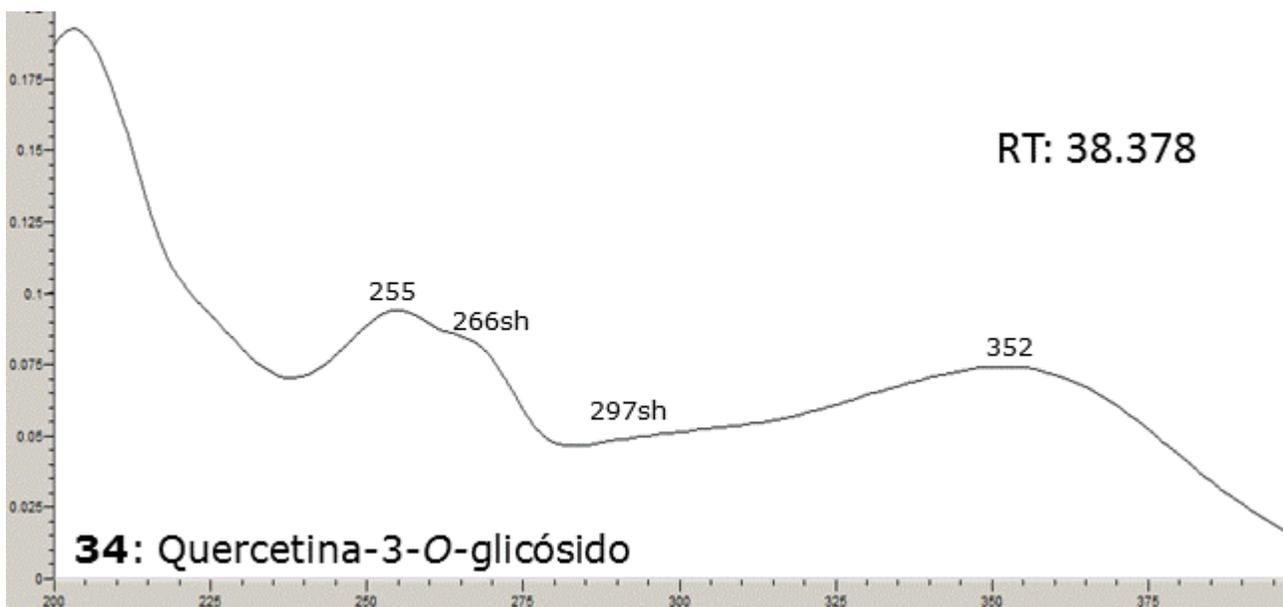
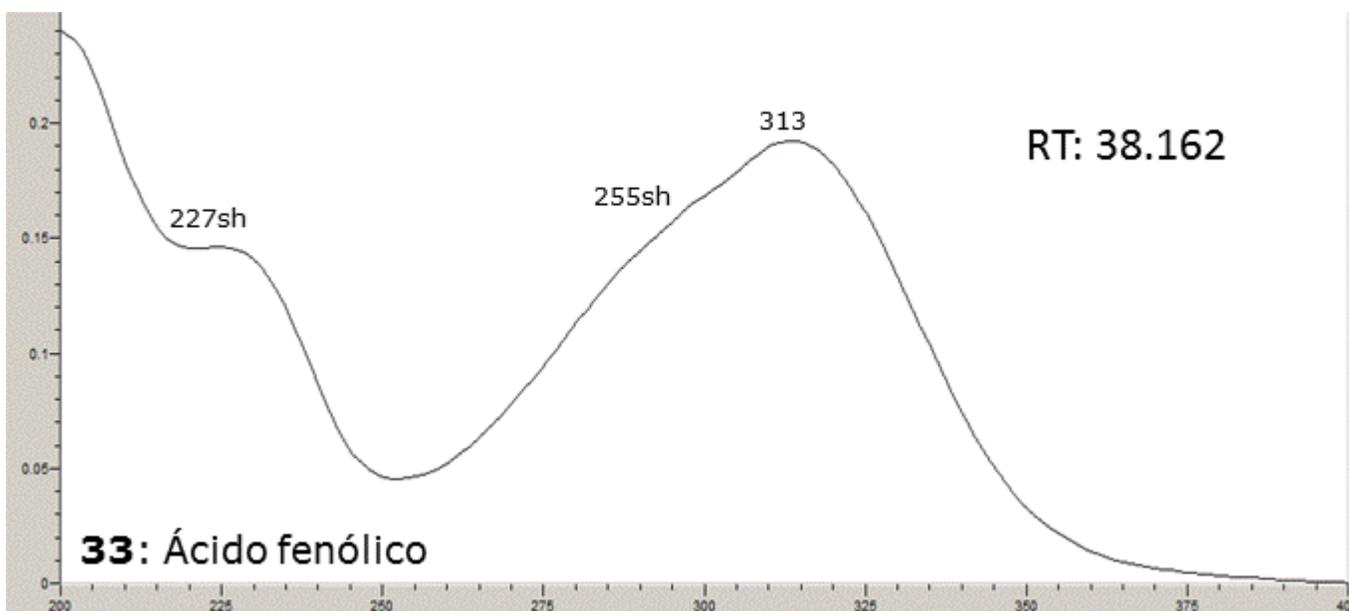


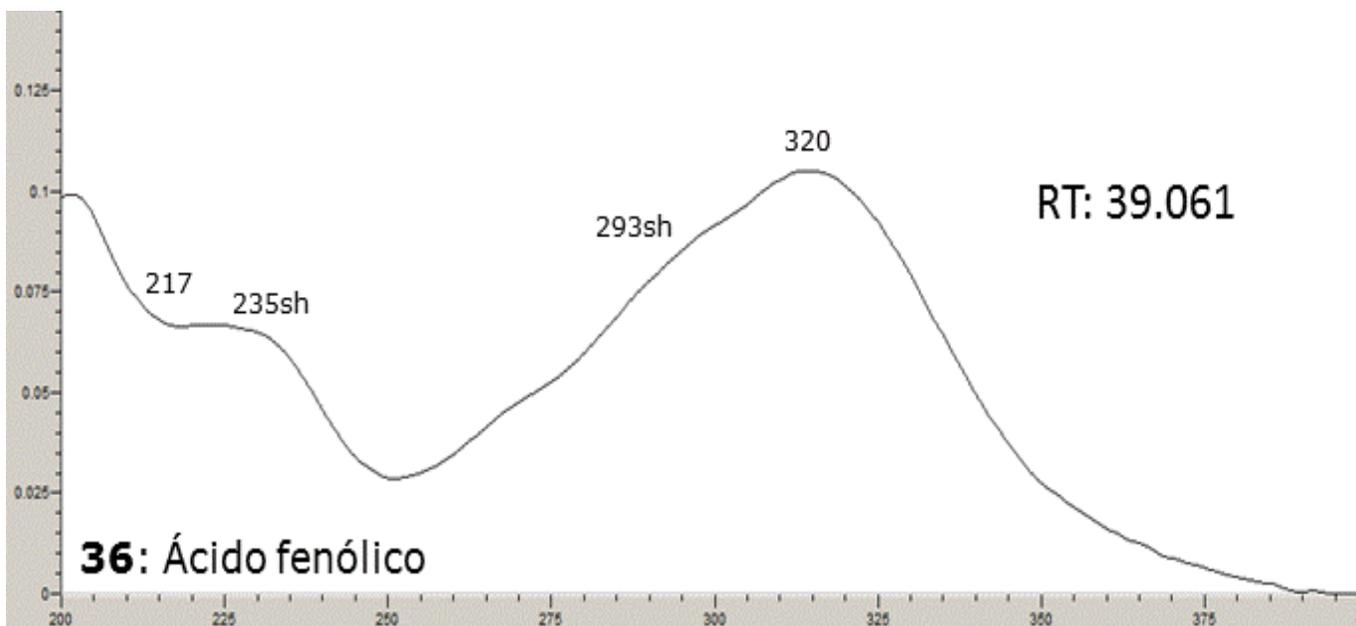
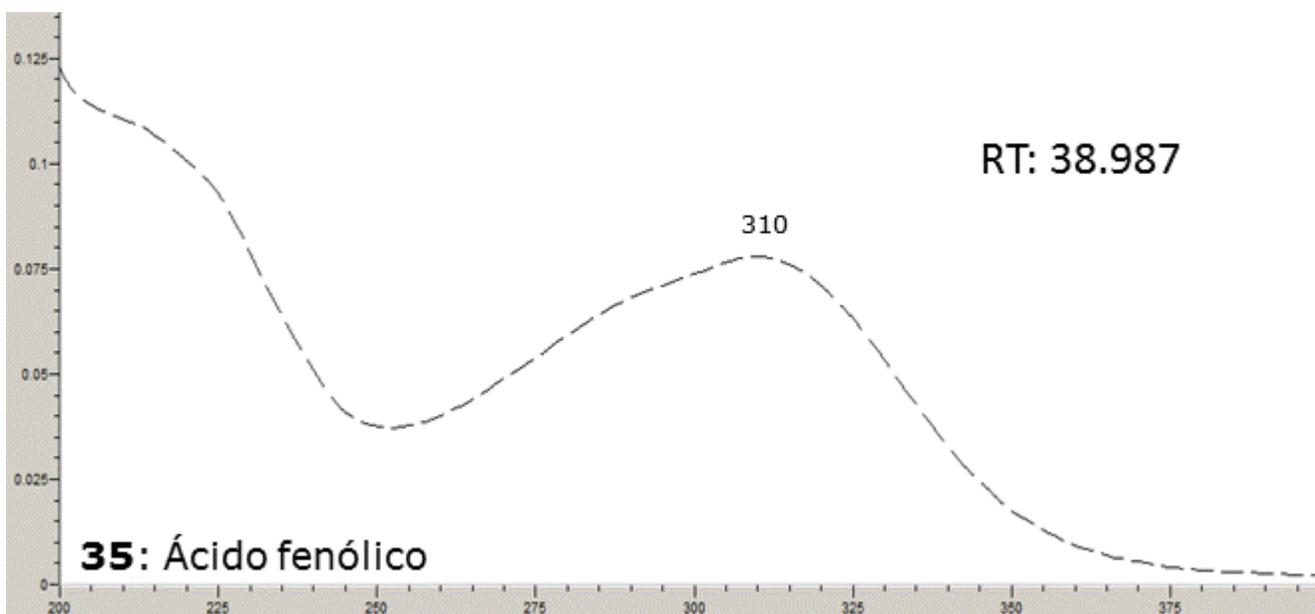


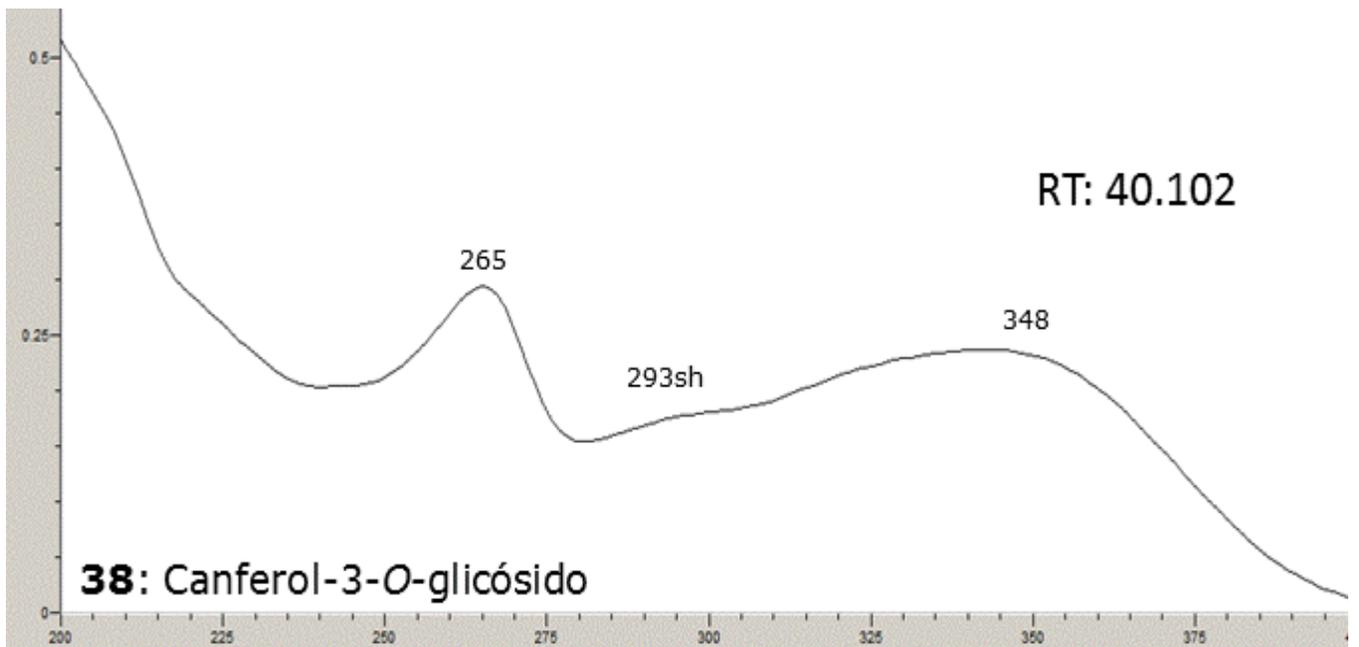
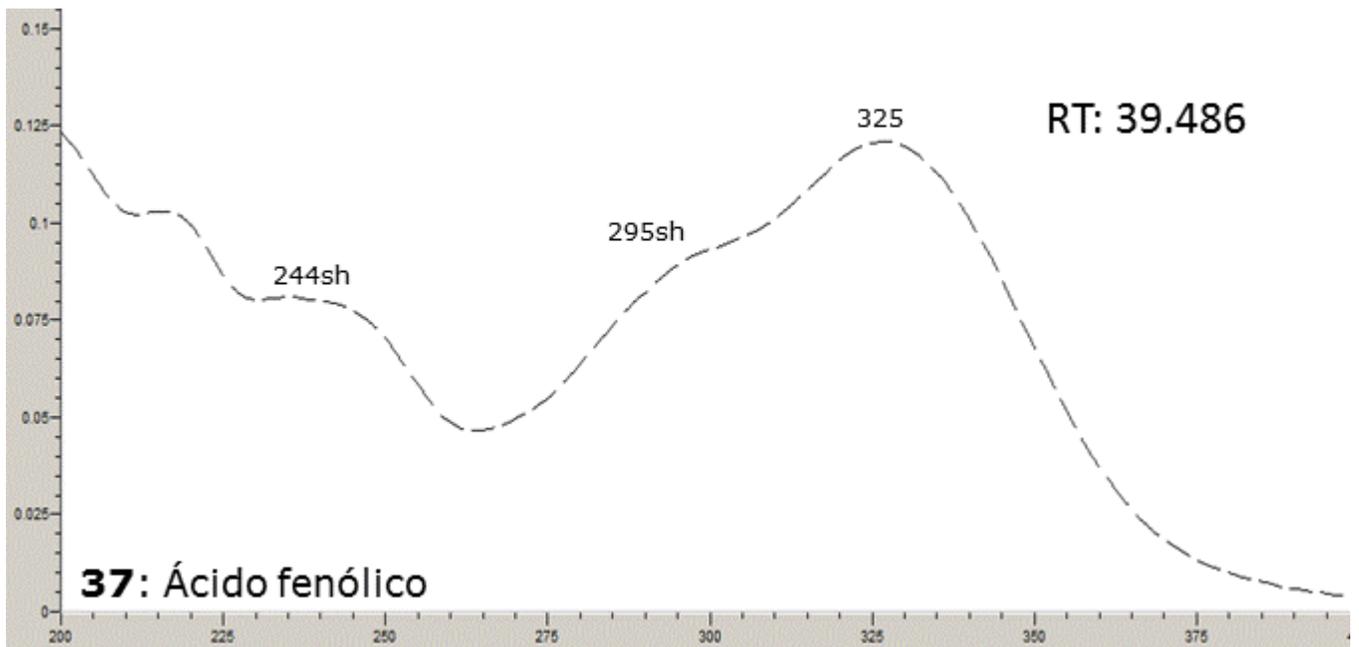


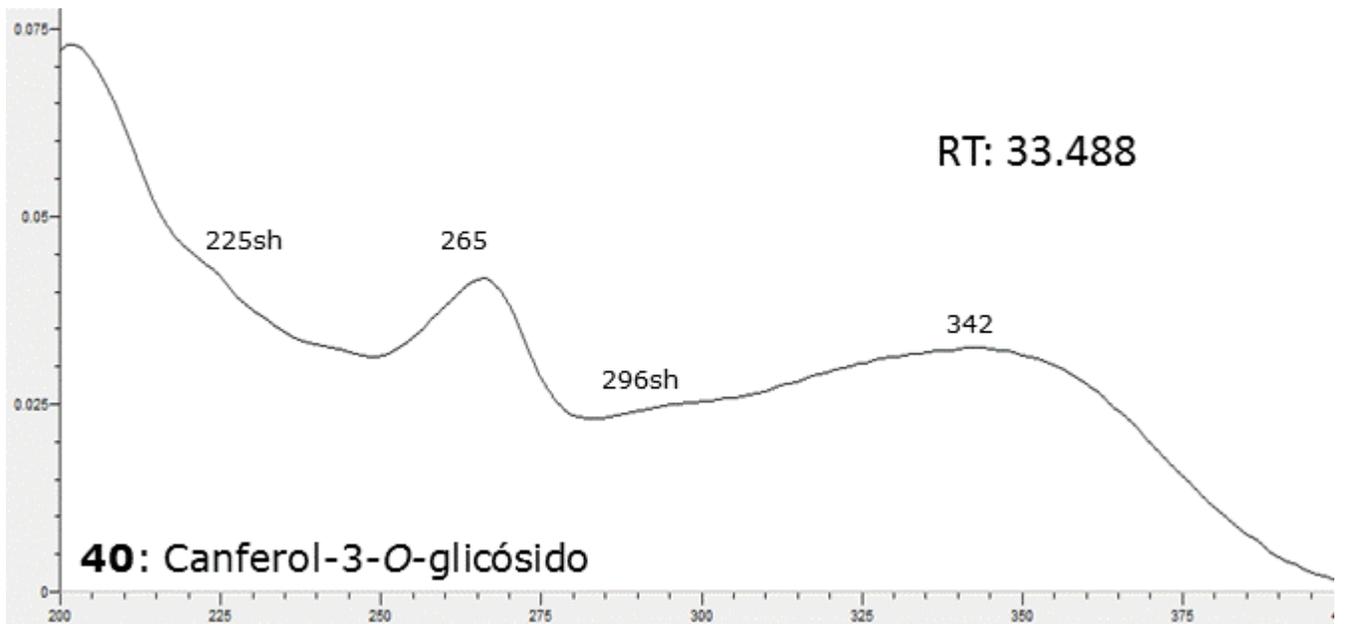
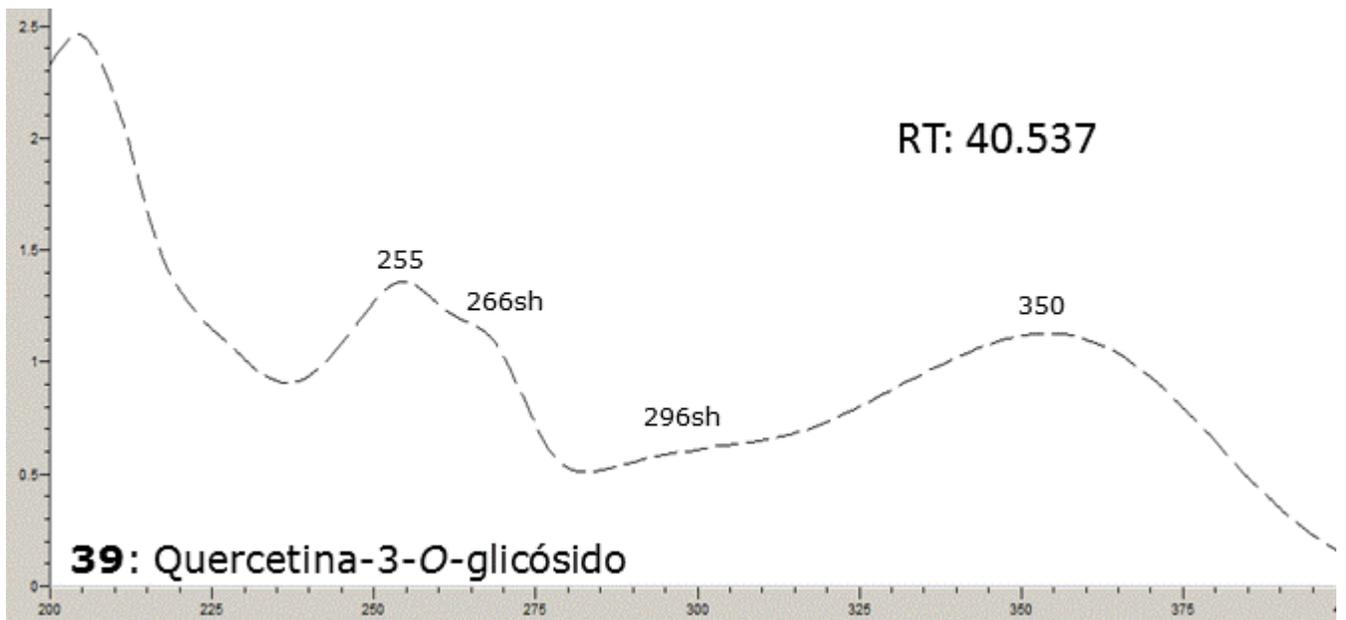


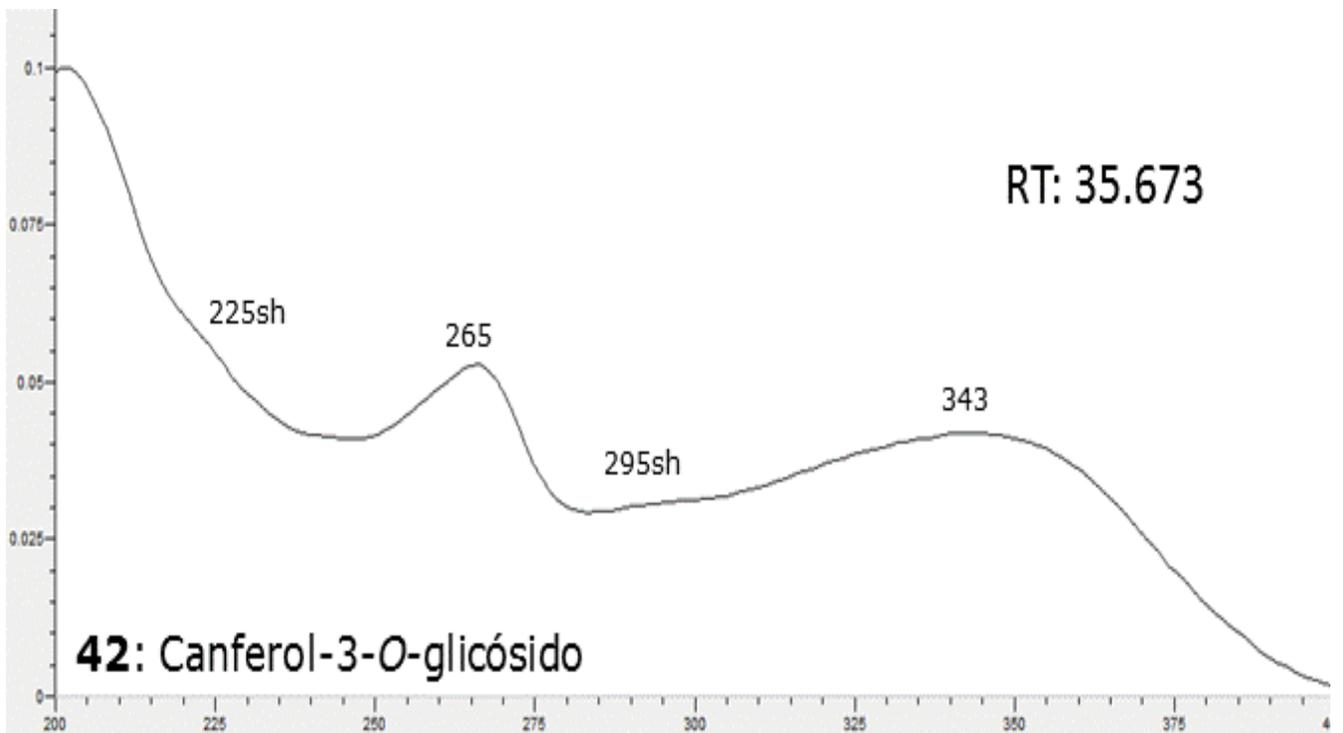
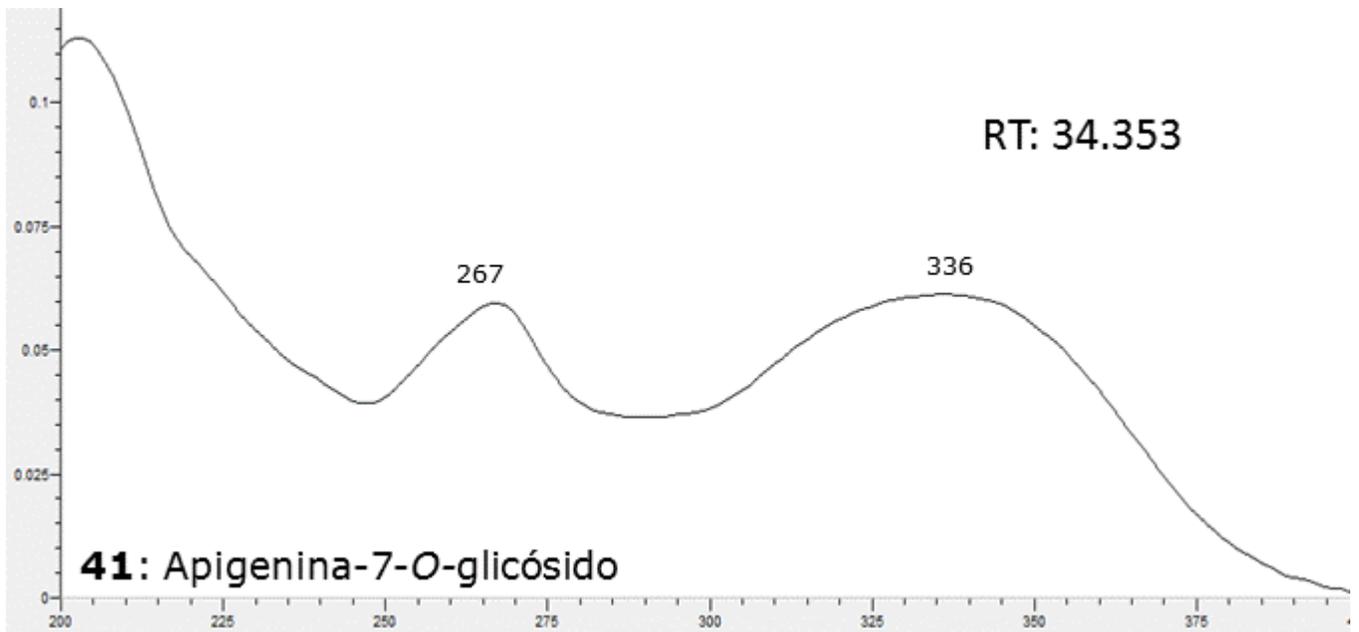


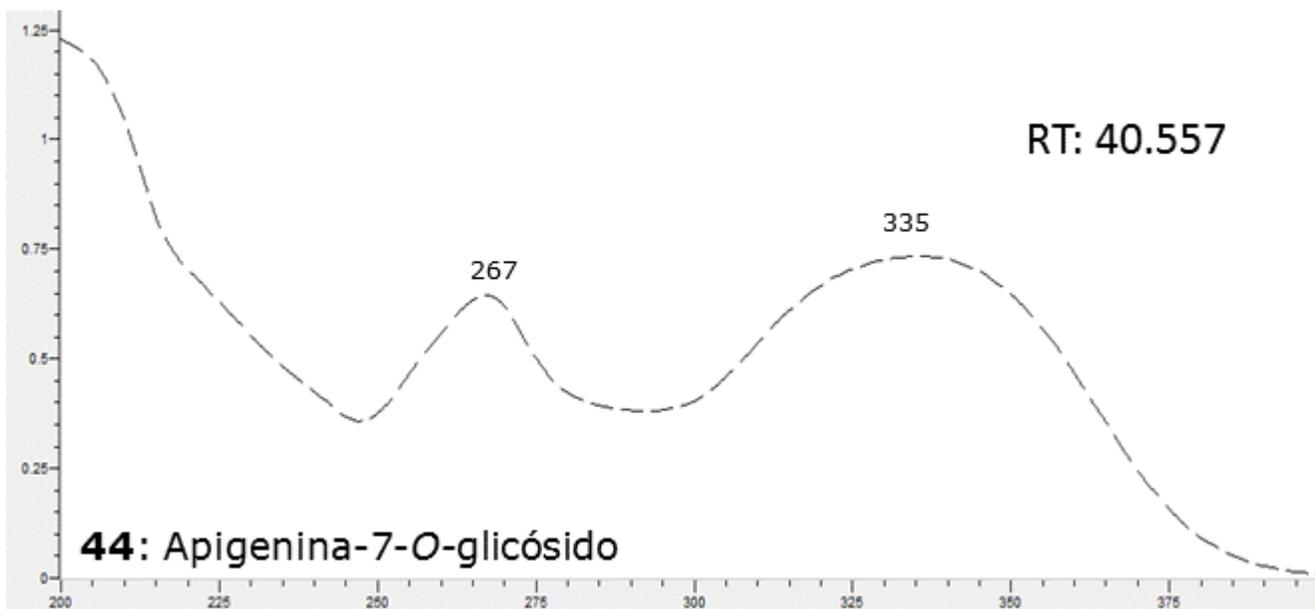
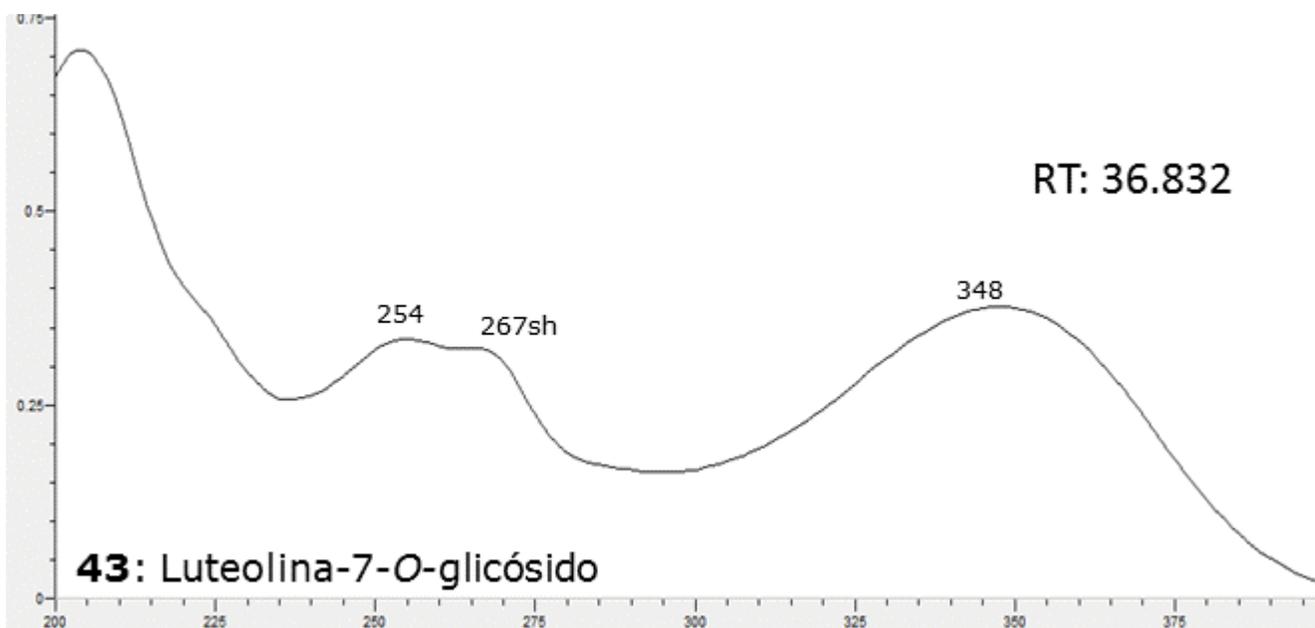




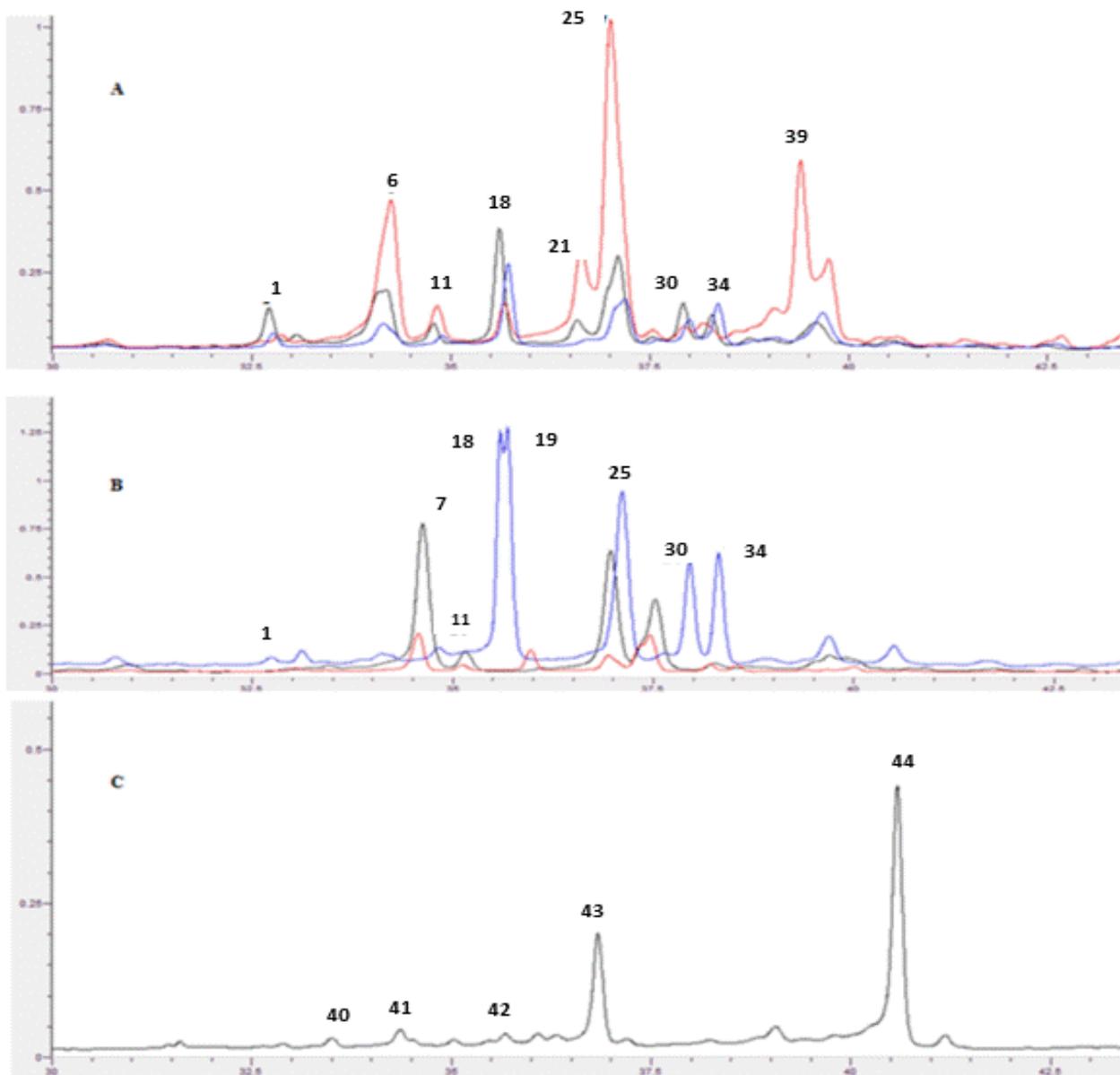




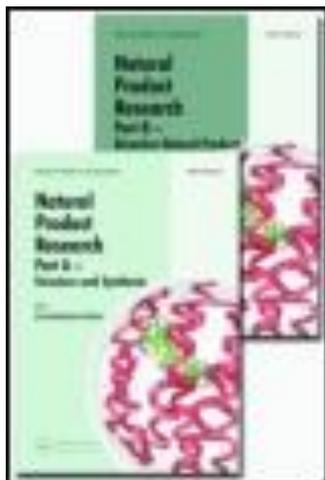




Anexo 3. Perfiles fenólicos de seis variedades de *Phaseolus vulgaris*: A: negro Vizcaya en negro, Pinto Mestizo en azul, y Canario Regional en rojo; B: Azufrado Namiquipa en negro, Pinto Bayacora en azul, y Flor de Junio Marcela en rojo; C: *P. coccineus*



This article was downloaded by: [Alfonso Reyes-Martinez] On: 01 July 2014, At: 10:30
Publisher: Taylor & Francis Informa Ltd Registered in England and
Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer
House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters

Publication details, including instructions for authors and
subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>

Evaluation of foliar phenols of 25 Mexican varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as antioxidants and varietal

markers

Alfonso Reyes-Martínez^a, Norma Almaraz-Abarca^a, Tzayhri Gallardo-Velázquez^b, María del Socorro González-Elizondo^a, Yolanda Herrera-Arrieta^a, Arnulfo Pajarito-Ravelero^c, Ruth Elizabeth Alanís-Bañuelos^a & Martha Isabel Torres-Morán^d Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional, 34220 Durango, Mexico^b Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, 11340 México, D. F., Mexico

^c Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria, 34170 Durango, Mexico^d Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, 45101 Zapopan, Mexico Published online: 27 Jun 2014.

To cite this article: Alfonso Reyes-Martínez, Norma Almaraz-Abarca, Tzayhri Gallardo-Velázquez, María del Socorro González-Elizondo, Yolanda Herrera-Arrieta, Arnulfo Pajarito-Ravelero, Ruth Elizabeth Alanís-Bañuelos & Martha Isabel Torres-Morán (2014): Evaluation of foliar phenols of 25 Mexican varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as antioxidants and varietal markers, *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, DOI: [10.1080/14786419.2014.930855](https://doi.org/10.1080/14786419.2014.930855)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2014.930855>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions

and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors,

and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

Evaluation of foliar phenols of 25 Mexican varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as antioxidants and varietal markers

Alfonso Reyes-Martínez^a, Norma Almaraz-Abarca^{a*}, Tzayhri Gallardo-Velázquez^b, M. Socorro González-Elizondo^a, Yolanda Herrera-Arrieta^a, Arnulfo Pajarito-Ravelero^c, Ruth Elizabeth Alanís-Bañuelos^a and Martha Isabel Torres-Morán^d

^aCentro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional, 34220 Durango, Mexico; ^bEscuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, 11340 México, D. F., Mexico; ^cInstituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria, 34170 Durango, Mexico; ^dCentro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, 45101 Zapopan, Mexico

(Received 11 March 2014; final version received 31 May 2014)

The antioxidant properties and the foliar phenol composition of 25 Mexican varieties of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) were evaluated. *Phaseolus coccineus* was analysed with comparative aims. The high performance liquid chromatography with photodiode array detection analysis revealed 27 phenolics in the leaves of *P. vulgaris* (13 quercetin-3-*O*-glycosides, 8 kaempferol-3-*O*-glycosides, 2 myricetin glycosides and 4 phenolic acids) and 5 in *P. coccineus* (2 kaempferol-3-*O*-glycoside, 2 apigenin-7-*O*-glycoside and 1 luteolin-7-*O*-glycoside). All extracts showed high levels of phenols and flavonoids (0.964–5.601 mg g⁻¹ dry tissue, and 0.287–1.418 mg g⁻¹ dry tissue, respectively) and relevant antioxidant properties, suggesting that the leaves of the varieties of *P. vulgaris* are a significant source of natural antioxidants. The foliar phenol profiles were species-specific and, besides, the qualitative variation allowed discriminating among varieties of *P. vulgaris*. These profiles can represent an important varietal authenticity proof.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*; antioxidant capacity; chemical markers; foliar flavonoids; phenolic acids

1. Introduction

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a legume cultivated all around the world. Diversification and domestication occurred in Mexico (Bitochi et al. 2013). The genus *Phaseolus* was originated at the American continent (Bitochi et al. 2013), it includes around 52 species, 13 being endemic to Mexico (Castillo et al. 2006). From many points of view, the most important species of *Phaseolus* is *P. vulgaris*. In Mexico, common bean grows under very diverse environmental conditions, suggesting that *P. vulgaris* has a highlighting biological diversity supported by an important genetic variability (Acosta-Gallegos et al. 2007).

Phenolic compounds are plant secondary metabolites, many of them, principally flavonoids, have biological properties with medical implications, antioxidant capacity being one of the most important properties because oxidants are involved in the development of cardiovascular disorders, neurodegenerative diseases and cancer (Ames et al. 1993). Flavonoids are important antioxidants that can be used in food industry, oppositely to the synthetic ones, which have been perceived as toxic and carcinogenic (Madhavi & Salunkhe 1996). The synthetic

*Corresponding author. Email: nalmaraz@ipn.mx, noralab@yahoo.com

accumulation of flavonoids in plant tissues have been reported with a species-specific (Almaraz-Abarca et al. 2013), which make them important chemotaxonomic markers. The flavonoid composition of *P. vulgaris* has been mainly studied in the grains (seed) as they are the edible structures (Romani et al. 2004). The foliar flavonoid composition has received little attention, probably because leaves are not consumed as food. However, in Mexico and other countries of Latin America, the leaves of common bean are used as forage, and their accumulated flavonoids could be an important source of antioxidants for animal health. Chemical fingerprinting could assist in the authentication of varieties of common bean and in generating a better knowledge for using all the potential of this crop. The aim of this study was to determine the foliar phenol composition of common bean (*P. vulgaris*) developed in the National Research Institute of Forestry, Agriculture and Rural Development (INIFAP Mexico), in order to evaluate the potential of these cultivars as sources of flavonoids, and to assess the significance of foliar phenol profiles as typification tools to discriminate among cultivars of common bean.

2. Results and discussion

2.1. Phenol and flavonoid contents

The levels of total phenols varied significantly between varieties (Table 1). They were lower than those reported for the leaves of *Mesembryanthemum edule* (68.75 mg g⁻¹ dry tissue) traditionally used in folk medicine in Africa (Falleh et al. 2011), and also lower than those reported for *Tamarix gallica* leaves (34.44 mg g⁻¹ dry tissue), used for the treatment of health disorders in Tunisia (Ksouri et al. 2009). Table 1 also shows the levels of flavonoids accumulated in the leaves of the analysed common bean varieties; they were significantly lower than those reported by Falleh et al. (2011) for the leaves of *M. edule* (22.21 mg g⁻¹ dry tissue) and closer to those reported for *T. gallica* leaves (3.91 mg g⁻¹ dry tissue) by Ksouri et al. (2009).

2.2. Phenol composition

Patterns comprising 13 quercetin-3-*O*-glycosides, 8 kaempferol-3-*O*-glycosides, 4 quercetin-3-*O*-glycosides and 4 phenolic acids were found in foliar tissues of *P. vulgaris*. The phenol composition of the leaves of *Phaseolus coccineus* was very different, formed by two kaempferol-3-*O*-glycosides, two apigenin-7-*O*-glycosides and one luteolin-7-*O*-glycoside. The retention times of these 32 phenols are shown in Figures S1–S4. In *P. coccineus*, flavonolignans were found as minor components and flavones were the major components, and in *P. vulgaris*, flavonolignans were the major components (Table S1). As a result of this variation, the chromatograms of six varieties are shown in Figure S5. Compound 1 (quercetin-3-*O*-glycoside) was present in all the varieties of common bean and it was among the most abundant compounds accumulated at the highest levels (Table S1). Quercetin is a flavonoid with a broad range of biological activity due to its *O*-orthodihydroxy structure in ring B, while kaempferol, which has a ring B bearing a single 4'-hydroxyl group, has a decreased antioxidant activity (Muller and Schuster 1999). Glycoside derivatives of quercetin are among the major flavonoids in plants and they are of interest by their favourable effect on the human health, among them *Ginkgo biloba* (Moukoko et al. 2012). This suggests that the main contribution to the antioxidant properties of the foliar extracts of common bean come from its quercetin derivatives; in each extract of *P. vulgaris*, quercetin glycosides represented between 50% and 75%. Recently it was reported that quercetin glycosides have an inhibitory activity of human histone deacetylases; due to the acetylation of histone proteins, cancer development, compounds having that activity are currently being investigated as potential preventive or therapeutic anticancer compounds (Berger et al. 2012). Our results

Downloaded by [Alfonso Reyes-Martinez] at 10:30 01 July 2014

Table 1. Total phenols, total flavonoid content, free radical scavenging activity (EC₅₀), TAC and iron-reducing power of the foliar extracts of 25 varieties of *P. vulgaris* and *P. coccineus* (26 days).

Sample	Total phenols (mg GAE g ⁻¹ dry tissue)		Total flavonoids (mg QE g ⁻¹ dry tissue)		EC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	TAC (µg AA mL ⁻¹)	RP (A _{700nm})
	(mg GAE g ⁻¹ dry tissue)	(mg GAE g ⁻¹ dry tissue)	(mg QE g ⁻¹ dry tissue)	(mg QE g ⁻¹ dry tissue)			
Bayo Victoria	5.601 ± 0.170 a	0.358 ± 0.025 ghi	2.450 ± 0.009 k	13.655 ± 0.264 cdf	0.901 ± 0.016 a		
Pinto Bravo	5.268 ± 0.085 a	0.390 ± 0.040 fghi	3.256 ± 0.020 c	11.111 ± 1.554 fghi	0.758 ± 0.006 de		
Azufrado Namiquipa	4.562 ± 0.331 b	0.536 ± 0.046 e	2.024 ± 0.011 q	8.184 ± 1.059 hi	0.508 ± 0.006 k		
Negro Vizcaya	4.485 ± 0.152 b	0.321 ± 0.024 hi	3.719 ± 0.019 a	15.733 ± 0.446 cde	0.751 ± 0.011 e		
Canario Regional	4.059 ± 0.173 bc	0.290 ± 0.023 i	3.349 ± 0.026 b	15.988 ± 1.732 bede	0.620 ± 0.004 i		
Negro San Luis	4.002 ± 0.068 bcd	0.351 ± 0.014 ghi	2.965 ± 0.018 e	19.932 ± 0.652 ab	0.765 ± 0.004 de		
FM 2000	3.839 ± 0.269 cde	0.846 ± 0.094 c	1.796 ± 0.007 r	7.803 ± 2.277 i	0.754 ± 0.012 de		
Azufrado Higuera	3.812 ± 0.076 cde	0.419 ± 0.003 fgh	2.350 ± 0.004 m	8.439 ± 0.847 hi	0.613 ± 0.003 i		
Pinto Sahlillo	3.576 ± 0.115 cde	0.287 ± 0.012 i	3.213 ± 0.002 c	12.553 ± 0.847 defg	0.583 ± 0.008 j		
Flor de Mayo M-38	3.492 ± 0.273 def	0.360 ± 0.013 ghi	2.914 ± 0.024 f	16.242 ± 1.096 bcd	0.926 ± 0.002 a		
<i>P. coccineus</i>	3.488 ± 0.091 def	1.034 ± 0.040 b	3.340 ± 0.012 b	9.329 ± 0.481 ghi	0.464 ± 0.004 lm		
Pinto Centauro	3.450 ± 0.71 def	0.681 ± 0.020 d	2.444 ± 0.016 kl	14.843 ± 0.446 cdef	0.873 ± 0.009 b		
Pinto Mestizo	3.381 ± 0.063 ef	0.296 ± 0.030 i	2.711 ± 0.015 hi	14.122 ± 1.101 cdef	0.692 ± 0.004 g		
Flor de Junio Ana	3.001 ± 0.110 fg	0.440 ± 0.033 fg	2.399 ± 0.006 l	17.09 ± 1.209 bc	0.648 ± 0.019 h		
Negro V8025	2.945 ± 0.154 fg	0.389 ± 0.024 fghi	2.692 ± 0.008 hi	11.238 ± 1.407 fghi	0.490 ± 0.002 kl		
Flor de Junio Marcela	2.732 ± 0.155 gh	0.454 ± 0.040 efg	1.763 ± 0.010 r	22.094 ± 1.517 a	0.832 ± 0.006 c		
Pinto Durango	2.616 ± 0.138 ghi	0.290 ± 0.006 i	3.065 ± 0.017 d	22.900 ± 1.376 a	0.776 ± 0.010 de		
Negro Frijozac 101	2.613 ± 0.056 ghi	0.311 ± 0.020 i	2.717 ± 0.011 h	12.595 ± 1.834 defg	0.449 ± 0.003 m		
Bayo Madero	2.294 ± 0.038 hij	1.418 ± 0.050 a	2.131 ± 0.008 p	22.688 ± 1.972 efg	0.829 ± 0.001 c		
Flor de Mayo Sol	2.133 ± 0.161 ijk	0.552 ± 0.055 e	1.474 ± 0.012 t	12.044 ± 0.264 efg	0.839 ± 0.014 c		
Negro Zacatecas	2.014 ± 0.214 jk	0.293 ± 0.005 i	2.665 ± 0.018 i	16.921 ± 1.328 bc	0.721 ± 0.010 f		
Pinto Bayacora	1.749 ± 0.094 jkl	0.487 ± 0.014 ef	1.601 ± 0.022 s	11.068 ± 0.127 fghi	0.585 ± 0.007 j		
Pinto Libertad	1.723 ± 0.482 kl	0.322 ± 0.026 hi	2.858 ± 0.017 g	12.637 ± 0.920 defg	0.703 ± 0.007 fg		
Negro Altaplano	1.699 ± 0.109 kl	0.331 ± 0.017 hi	2.584 ± 0.006 j	11.620 ± 1.036 fghi	0.776 ± 0.006 de		
Río Grande Querétaro	1.378 ± 0.135 lm	0.451 ± 0.013 efg	2.195 ± 0.013 o	8.269 ± 1.749 hi	0.662 ± 0.007 h		
Vaquita	0.964 ± 0.048 m	0.309 ± 0.025 i	2.27 ± 0.015 n	12.510 ± 1.909 defg	0.721 ± 0.002 f		
Quercetin		0.400 ± 0.006 v	Not evaluated	Not evaluated	0.780 ± 0.004 d		
Quercitrin		1.293 ± 0.018 u	22.448 ± 0.815 a	Not evaluated	0.395 ± 0.004 d		
Caffeic acid		0.403 ± 0.003 v	Not evaluated	Not evaluated	Not evaluated		
Ascorbic acid		Not evaluated	Not evaluated	Not evaluated	0.653 ± 0.005 h		

Notes: GAE, gallic acid equivalents; QE, quercetin equivalents; EC₅₀, efficient concentration at 50%; TAC, total antioxidant capacity; RP, iron-reducing power.

the phenol composition of leaves was different from the composition reported for seeds by Romani et al. (2004), who found several kaempferol and quercetin glycosides, isoflavones and anthocyanins in different cultivars of *P. vulgaris*.

2.3. Antioxidant capabilities

A linear reduction of DPPH* concentration associated with increase in the flavonol concentration in the extracts was observed ($0.9307 > r > 0.9987$). The EC₅₀ values ranged significantly between varieties (Table 1). The antiradical activities were higher than those found for foliar extracts of *Smilax sonchifolius* (EC₅₀ values between 50.7 and 11.3 μg mL⁻¹) reported by Arnao et al. (2011). The antiradical activities of the varieties Flor de Mayo Sol (EC₅₀ = 1.474 μg mL⁻¹) and Pinto Bayacora (EC₅₀ = 1.601 μg mL⁻¹) were similar to that of quercitrin (EC₅₀ = 1.293 μg mL⁻¹). The total antioxidant capacity (TAC) values for each sample are given in Table 1. Pinto Durango was the variety with the highest TAC (22.9 μg mL⁻¹), this activity was similar to that of quercitrin, but lower than that reported by Falleh et al. (2011) for the leaves of *M. edule*. The phenols of the foliar extracts of *P. vulgaris* also showed an important capability to donate electron to free radicals, which contributes to stabilisation of reactive species and ending a free radical chain reaction, as it is shown by the values of absorbances at 700 nm (Table 1). All the extracts assayed showed higher iron-reducing power than quercitrin, 17 had higher reduction power than ascorbic acid and 6 varieties had reduction power values higher than quercetin ($A_{700\text{nm}} = 0.780$). Excepting the samples of Negro V8025 and Negro Frijozac 101 ($A_{700\text{nm}} = 0.490$ and 0.449 , respectively), all the foliar extracts of *P. vulgaris* showed higher iron-reducing capacities than those found for rutin, an important natural antioxidant flavonoid, and its acylated derivatives (values of $A_{700\text{nm}}$ between approximately 0.020 and 0.500) reported by Lue et al. (2010).

2.4. Variation in the foliar phenol profiles

The foliar phenol profiles have been reported to have a species-specific tendency in several groups of plants like in *Agave* (Almaraz-Abarca et al. 2013), among others. This tendency was corroborated in this study for *P. vulgaris* and *P. coccineus* (Figures S5 and S6). Some chemical differences in the foliar phenol composition at level of varieties were found, as it is observed in the dendrogram resulted from a cluster analysis (Figure S6) based on a binary matrix of presence-absence constructed with the foliar phenol profile of each variety. Each variety had a typical foliar phenol profile; this makes those profiles important tools for the evaluation of variety authenticity for this crop plant at relatively early stages of development (26 days), mainly for varieties having very similar seeds (Figure S7). Pinto and Negro varieties shared more phenolic compounds, one to each other and were grouped in the same clade (B) by the cluster analysis, while the rest of the varieties formed a separated group (A) (Figure S6).

3. Conclusions

Varieties of common bean can synthesise and accumulate different phenolic compounds in leaves, majorly quercetin-3-*O*-glycosides, in a typical manner for each variety; this reveals the foliar phenol profiles of *P. vulgaris* as important chemical markers for the determination of authenticity of varieties. The high antioxidant capacities found for the foliar phenol extracts suggest that the leaves of that species are a valuable source of natural antioxidant phenols; this is relevant for animal health because the leaves of common bean are used to elaborate forage. The chemical variability of *P. vulgaris* offers the opportunity for developing new cultivars with

enhanced accumulation of compounds having health and nutritional effects for human and animals, through breeding programmes.

Supplementary material

Experimental details relating to this article are available online, alongside Table S1 and Figures S1–S7.

Acknowledgements

The authors thank the Comisión de Fomento a las Actividades Académicas, Instituto Politécnico Nacional (COFAA IPN) for the research grant. The authors also thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the grant given to one of them. They also thank Dr. Jorge Alberto Acosta Gallegos of the Bean Program, Regional Research Center of Bajío, National Research Institute of Forestry, Agriculture, and Livestock (INIFAP Mexico) for providing the registers of the analysed varieties of common bean.

References

- Acosta-Gallegos JA, Kelly JD, Gepts P. 2007. Prebreeding in common bean and use of genetic diversity from wild germoplasm. *Crop Sci.* 47:S44–S59.
- Almaraz-Abarca N, Delgado-Alvarado EA, Ávila-Reyes JA, Uribe-Soto JN, González-Valdez LS. 2013. The phenols of genus *Agave* (Agavaceae). *J Biomater Nanobiotechnol.* 4:295–306.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Nat Acad Sci USA.* 90:7915–7922.
- Arnao I, Seminario J, Cisneros R, Trabucco J. 2011. Potencial antioxidante de 10 accesiones de yacón, *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl) H. Robinson, procedentes de Cajamarca – Perú. *Anal Fac Med.* 72:239–243.
- Berger A, Venturelli S, Kallnisdhies M, Böcker A, Busch C, Weiland T, Noor S, Lechner C, Weiss TS, Lauer UM, et al. 2012. Kaempferol, a new nutrition-derived pan-inhibitor of human histone deacetylases. *J Nutr Biochem.* 24:977–985.
- Bitochi E, Bellucci E, Giordani A, Rau D, Rodríguez M, Biagetti E, Santilocchi R, Spagnoletti ZP, Gioia T, Logozzo G, et al. 2013. Molecular analysis of the parallel domestication of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. *New Phytol.* 197:300–313.
- Castillo MM, Ramírez VP, Castillo GF, Miranda CS. 2006. Diversidad morfológica de poblaciones nativas de frijol común y frijol ayacote del oriente del Estado de México. *Fitotéc Mex.* 29:111–119.
- Falleh H, Ksouri R, Medini F, Guyot S, Abdely C, Magné C. 2011. Antioxidant activity and phenolic composition of the medicinal and edible halophyte *Mesembryanthemum edule* L. *Ind Crops Prod.* 34:1066–1071.
- Ksouri R, Falleh H, Megdiche W, Trabelsi N, Mhamdi B, Chaieb K, Bakrouf A, Magné C, Abdely C. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food Chem Toxicol.* 47:2083–2091.
- Lue BM, Nielsen NS, Jacobsen C, Hellgren L, Guo Z, Xu X. 2010. Antioxidant properties of modified rutin esters by DPPH, reducing power, iron chelation and human low density lipoprotein assays. *Food Chem.* 123:221–230.
- Madhavi DL, Salunkhe DK. 1996. Toxicological aspects of food antioxidants. In: Madhavi DL, Deshpande SS, Salunkhe DK, editors. Food antioxidants, technological, toxicological, and health perspectives. New York: Marcel Dekker; p. 267–360.
- Mouren X, Caillard P, Schwartz F. 1994. Study of the antiischemic action of EGb 761 in the treatment of peripheral arterial occlusive disease by TcPo2 determination. *Angiology.* 45:413–417.
- Rice-Evans C. 1999. Screening of phenolics and flavonoids for antioxidant activity. In: Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T, editors. Antioxidant food supplements in human health. San Diego (CA): Academic Press; p. 239–253.
- Romani A, Vignolini P, Galardi C, Mulinacci N, Benedettelli S, Heimler D. 2004. Germoplasm characterization of Zolfino landraces (*Phaseolus vulgaris* L.) by flavonoid content. *J Agric Food Chem.* 52:3838–3842.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Evaluation of foliar phenols of 25 Mexican varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as antioxidants and varietal markers

Alfonso Reyes-Martínez^a, Norma Almaraz-Abarca^{a,*}, Tzayhri Gallardo-Velazquez^b, María del Socorro González-Elizondo^a, Yolanda Herrera-Arrieta^a, Arnulfo Pajarito-Ravelero^c, Ruth Elizabeth Alanís-Bañuelos^a and Martha Isabel Torres-Morán^d

^a*Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional, 34220 - Durango, México;* ^b*Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, 11340 - México, D. F., México;* ^c*Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria, 34170 - Durango, México;* ^d*Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, 45101 - Zapopan, México*

*Corresponding author. Norma Almaraz-Abarca, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional, Durango, Durango, 34220, México, Tel/Fax: +52 618 8142091. Email: nalmaraz@yahoo.com; noralab@yahoo.com

Evaluation of foliar phenols of 25 Mexican varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as antioxidants and varietal markers

The antioxidant properties and the foliar phenol composition of twenty five Mexican varieties of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) were evaluated. *Phaseolus coccineus* was analysed with comparative aims. The high performance liquid chromatography with photodiode array detection (HPLC-DAD) analysis revealed twenty seven phenolics in the leaves of *P. vulgaris* (thirteen quercetin-3-*O*-glycosides, eight kaempferol-3-*O*-glycosides, two myricetin glycosides, and four phenolic acids) and five in *P. coccineus* (two kaempferol-3-*O*-glycoside, two apigenin-7-*O*-glycoside, and one luteolin-7-*O*-glycoside). All extracts showed high levels of phenols and flavonoids (0.964-5.601 mg/g dry tissue, and 0.287-1.418 mg/g dry tissue, respectively) and relevant antioxidant properties, suggesting that the leaves of those varieties of *P. vulgaris* are a significant source of natural antioxidants. The foliar phenol profiles were species-specific and besides, the qualitative variation allowed discriminating among varieties of *P. vulgaris*. Those profiles can represent an important varietal authenticity proof.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*; antioxidant capacity; chemical markers; foliar flavonoids; phenolic acids

1. Experimental

1.1 Plant material and preparation of extracts

Seeds of 25 varieties of common bean were obtained from the *Phaseolus vulgaris* collection of INIFAP Durango, Mexico (Figure S7). Seeds of each variety were germinated in May 2012, in germination beds, at room temperature, and photoperiod of 13 h light and 11 h dark. The germination beds were watered each 48 h. The substrate was formed by moss peat and pre-mixed dirt for pots and garden (Vigoro®) (0.5:1.5). The leaves of 30 plantlets, aged 26 days, of each cultivar were combined and three pools of samples were formed and separately analyzed. The foliar tissues were dried in a ventilated oven at 40°C to constant weight, ground, and kept in paper

bags, in darkness, and at room temperature until analysis. With comparative aims, seeds of *Phaseolus coccineus*, collected in Vicente Guerrero, Durango, Mexico (23° 46' 06'' N, 103° 51' 35'') in November 2011, were germinated and analyzed in the same manner. Voucher specimens of *P. coccineus* were deposited at Herbarium CIIDIR (curatorial number: CC42853). Flavonoids were extracted from dried grinded foliar tissue (1 g) by maceration in 20 mL 50% ethanol (v/v), for 24 h, in darkness, and at room temperature. The extracts were centrifuged (4800 x g), for 5 min, at room temperature, and the supernatants separated. The pellets were re-extracted in 20 mL 50% ethanol (v/v), for one hour, and then centrifuged at the same conditions. Both supernatants of the same sample were brought together and formed the total extract; an aliquot (10 mL) was separated for the further analysis. The total extracts were concentrated to a half volume and then fractionated twice with 10 mL of ethyl acetate. The organic fraction (ethyl acetate) was concentrated to dryness and then re-dissolved in 3 mL ethanol; aliquots (100 µL) were taken to be used in the HPLC-DAD analysis.

1.2 Determination of total phenols

The concentrations of total phenols of the foliar tissues of each cultivar of *Phaseolus vulgaris* were determined using Folin-Ciocalteu reagent, according to Falleh *et al.* (2011). The phenol contents were expressed as mg gallic acid equivalents g⁻¹ dry tissue (mg GAE g⁻¹ dry tissue).

1.3 Determination of total flavonoids

Flavonoid content was determined following a method reported elsewhere (Lauronson-Broyer & Lebreton, 1993). The flavonoid content in each sample was expressed as mg of quercetin equivalents g⁻¹ dry tissue (mg QE g⁻¹ dry tissue).

1.4 HPLC/DAD analysis

To determine the flavonoid profiles, a method previously described (Campos & Markham, 2007) was used, on a Perkin Elmer Series 200 HPLC system and a Perkin Elmer Brownlee Analytical C18 column (4.6 x 250 mm, 5 µm). Spectral data for all peaks were accumulated in the range 200 to 400 nm using diode-array detection (Perkin Elmer Series 200). Structural information was obtained by direct comparisons of retention times and UV spectra of resolved compounds with those of standards and according to the compilations published elsewhere (Campos & Markham, 2007; Mabry, Markham, & Thomas, 1970). Quantitative determinations of the major compounds were made by an external standard method, with commercial reference (quercitrin), by area ratio

measurements. The content of each compound was expressed as μg of quercitrin equivalents g^{-1} dry tissue ($\mu\text{g QiE g}^{-1}$ dry tissue).

1.5 Free radical scavenging activity

The DPPH* method described by Campos (1997) was used to evaluate the free radical scavenging activity. Antiradical activities were calculated in terms of EC_{50} and expressed as $\mu\text{g mL}^{-1}$. Quercetin, quercitrin and caffeic acid, used as reference samples, were assayed in the same manner.

1.6 Total antioxidant capacity (TAC)

The TAC of each extract was evaluated by a previously described method (Prieto, Pineda, & Aguilar, 1999). The absorbance of reaction mixtures was registered at 695 nm. TAC was expressed as μg ascorbic acid equivalents mL^{-1} ($\mu\text{g AAE mL}^{-1}$). Quercitrin was analyzed as reference in the same manner.

1.7 Iron reducing power (RP)

The RP of the foliar extracts was evaluated according to a method reported elsewhere (Yang, Guo, & Yuan, 2008). The highest absorbance values at 700 nm indicated the greatest capacity of reducing ferric (Fe^{3+}) to ferrous (Fe^{2+}) ions. The references quercetin, quercitrin, and ascorbic acid were analyzed in the same manner.

1.8 Data analysis

Data were subjected to an analysis of variance ($p \leq 0.05$) and means separated by Duncan's multiple range test. The results were processed by Costat computer program (1982). A presence-absence matrix formed by all individual samples vs. all resolved compounds (26 samples vs. 32 compounds) was constructed; a cluster analysis was carried out from the matrix, using the software Past 2.12 (Hammer, Harper, & Ryan, 2001).

References

Campos, R.M.G. (1997). *Caracterização do polen apícola pelo seu perfil em compostos fenólicos e pesquisa de algumas actividades bilológicas* (Unpublished doctoral dissertation). University of Coimbra, Coimbra.

- Campos, M.G., & Markham, K.R. (2007). *Structure Information from HPLC and on-line Measured Absorption spectra: flavones, flavonols and phenolic acids*. Coimbra: Coimbra University Press.
- Falleh, H., Ksouri, R., Medini, F., Guyot, S., Abdelly, C., & Magné, C. (2011). Antioxidant activity and phenolic composition of the medicinal and edible halophyte *Mesembryanthemum edule* L. *Industrial Crops and Products*, *34*, 1066-1071.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., & Ryan, P.D. (2001). Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*, *4*, 9.
- Lauranson-Broyer, J., & Lebreton, P. (1993). Flavonoids and morphological traits of needles, as markers of natural hybridization between *Pinus uncinata* Ram and *Pinus sylvestris* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, *21*, 241-247.
- Mabry, T.J., Markham, K.M., & Thomas, M.B. (1970). *The Systematic Identification of Flavonoids*. New-York, NY: Springer-Verlag.
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, *269*, 337-341.
- Yang, J., Guo, J., & Yuan J. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT-Food Science and Technology*, *41*, 1060-1066.

Table S1. Contents of six of the major phenol compounds present in foliar extracts of 25 varieties of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus* (26 days).

Variety	Compound ($\mu\text{g QiE g}^{-1}$ dry tissue)					
	1	7	13	17	31	32
Negro Zacatecas	20.719 \pm 0.531	241.438 \pm 1.498	16.978 \pm 0.009	196.618 \pm 1.085	Not found	Not found
Negro San Luis	7.266 \pm 0.029	Not found	170.143 \pm 0.267	98.705 \pm 0.097	Not found	Not found
Negro Altiplano	20.86 \pm 0.801	Not found	42.877 \pm 0.430	60.791 \pm 0.085	Not found	Not found
Negro Vizcaya	27.41 \pm 0.340	Not found	71.223 \pm 0.336	80.431 \pm 0.139	Not found	Not found
Negro v8025	39.424 \pm 0.356	Trace	159.496 \pm 1.127	64.892 \pm 0.024	Not found	Not found
Negro Frijozac	37.266 \pm 0.165	148.848 \pm 0.934	46.762 \pm 0.561	22.014 \pm 0.012	Not found	Not found
Pinto Mestizo	14.604 \pm 0.077	Not found	72.517 \pm 0.532	72.805 \pm 0.429	Not found	Not found
Pinto Saltillo	Not found	Not found	15.899 \pm 0.894	42.949 \pm 1.274	Not found	Not found
Canario Regional	Not found	Not found	14.604 \pm 0.462	118.27 \pm 2.650	Not found	Not found
Azufrado Namiquipa	Not found	Not found	Not found	58.992 \pm 0.226	Not found	Not found
Azufrado Higuera	Not found	Not found	Not found	140.071 \pm 0.893	Not found	Not found
Flor de Mayo M-38	Not found	Not found	52.086 \pm 0.442	116.25 \pm 1.329	Not found	Not found
Río Grande Querétaro	Not found	Not found	97.985 \pm 1.004	86.402 \pm 0.486	Not found	Not found
Pinto Libertad	28.848 \pm 0.037	Not found	21.007 \pm 0.022	143.23 \pm 1.067	Not found	Not found
Vaquita	Not found	Not found	61.007 \pm 0.019	145.035 \pm 0.592	Not found	Not found
Pinto Bravo	18.417 \pm 0.034	Not found	21.726 \pm 0.174	103.23 \pm 1.296	Not found	Not found
Pinto Durango	Not found	Not found	153.021 \pm 1.452	125.323 \pm 0.224	Not found	Not found
Pinto Bayacora	7.625 \pm 0.259	Not found	66.474 \pm 0.977	93.812 \pm 0.359	Not found	Not found
Flor de Mayo Sol	Not found	99.424 \pm	Not found	55.755 \pm 0.242	Not found	Not found
Flor de Junio Ana	22.805 \pm 0.051	Not found	63.453 \pm 0.832	90.359 \pm 0.290	Not found	Not found
Flor Junio Marcela	8.705 \pm 0.079	Not found	36.043 \pm 1.069	89.856 \pm 0.006	Not found	Not found
Bayo Madero	30.647 \pm 0.102	Not found	54.46 \pm 0.048	149.424 \pm 3.782	Not found	Not found
Bayo Victoria	Not found	Not found	74.604 \pm 0.693	93.237 \pm 0.390	Not found	Not found
FM 2000	20.647 \pm 0.160	27.553 \pm 0.242	78.848 \pm 0.382	48.633 \pm 0.300	Not found	Not found
Pinto Centauro	25.107 \pm 0.028	36.618 \pm 0.555	26.69 \pm 0.000	78.705 \pm 0.570	Not found	Not found
<i>P. coccineus</i>	Not found	Not found	Not found	Not found	57.985 \pm 0.389	142.302 \pm 1.220

Notes: QiE, quercitrin equivalents.

The number of compounds correspond to Figures S1 to S4.

The values represent the mean and standard deviation of three independent analyses.

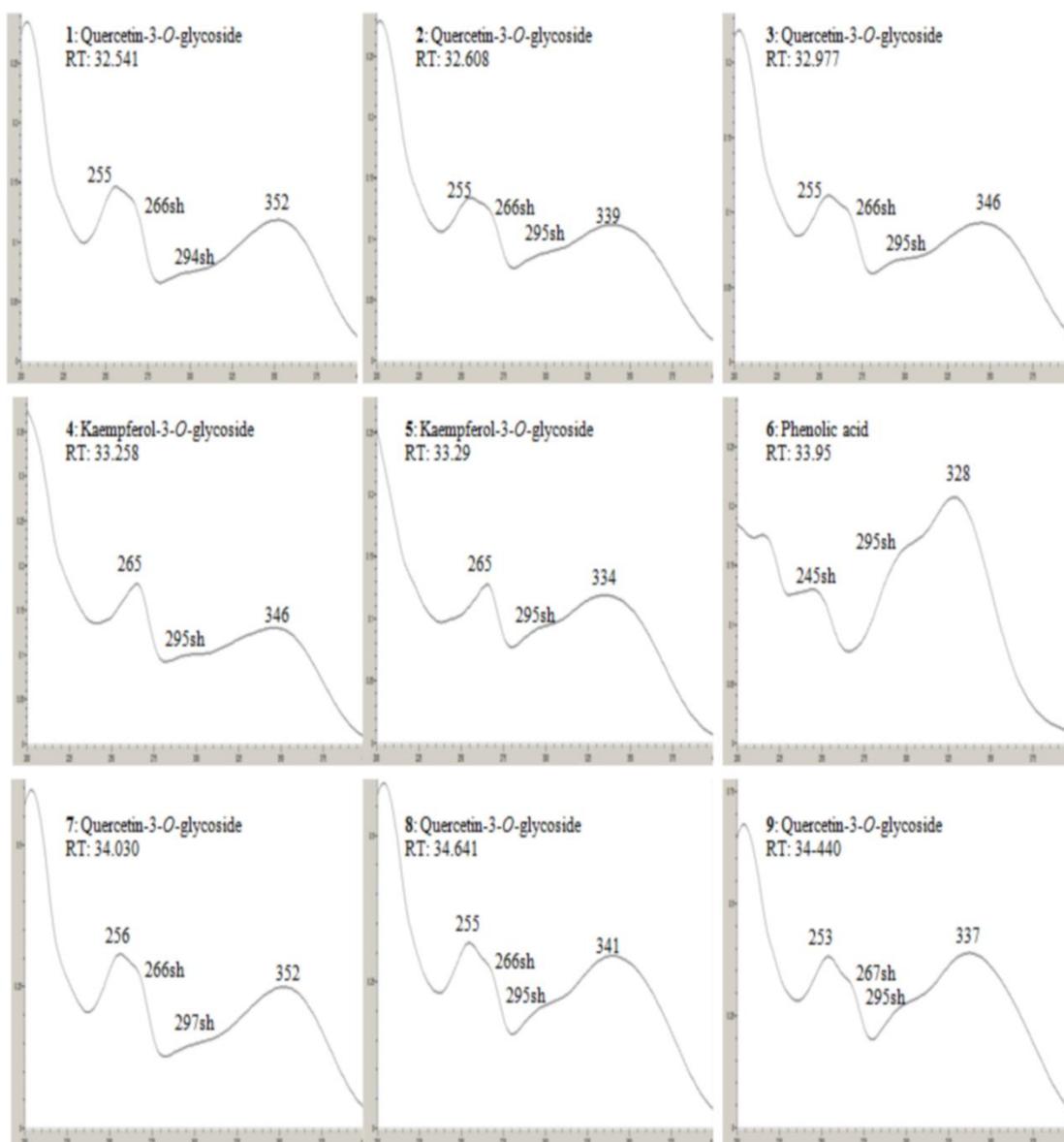


Figure S1. UV spectra, λ_{max} and retention time of the phenolic compounds **1** to **9** of the foliar tissues of 25 varieties of *Phaseolus vulgaris*.

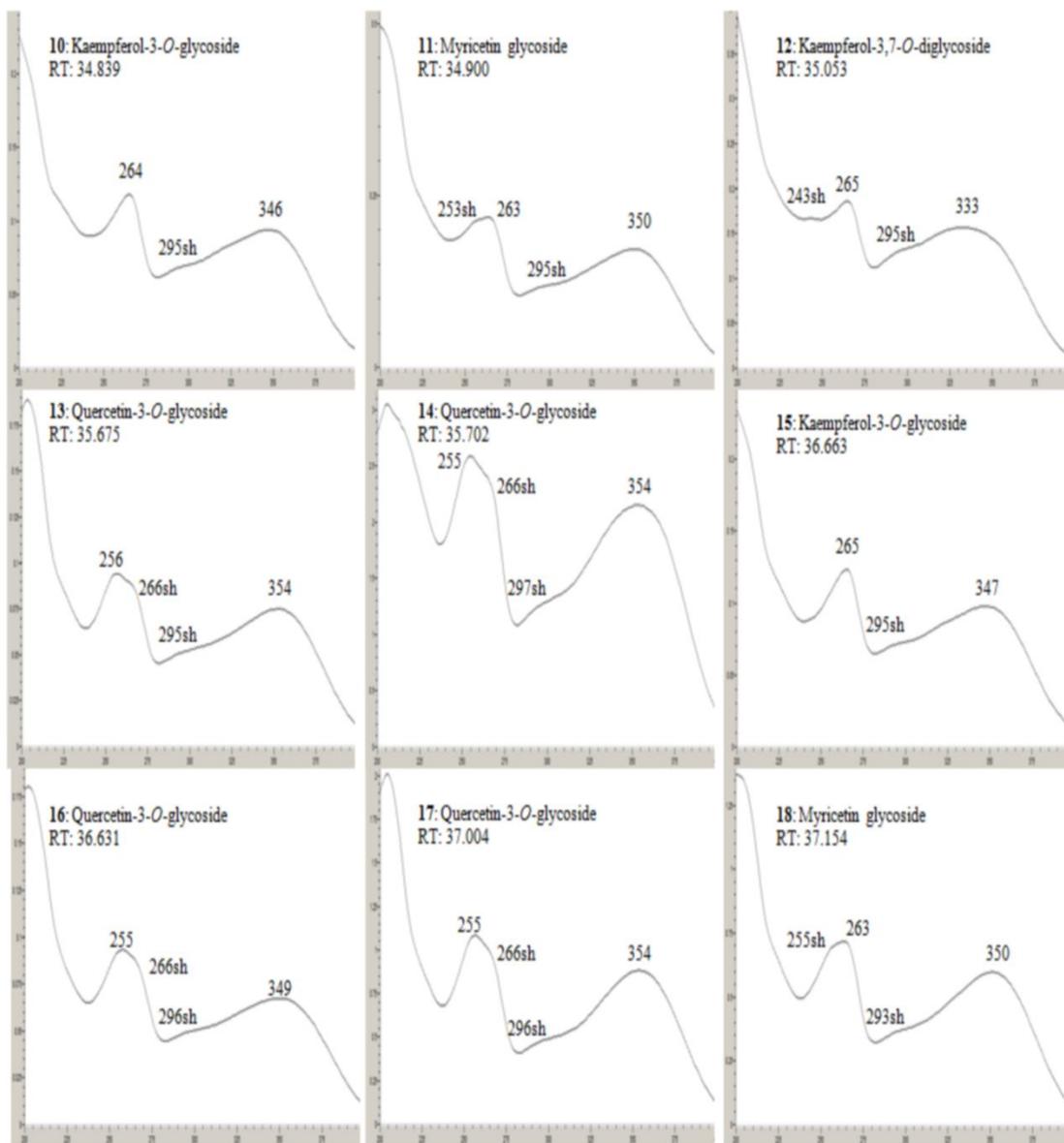


Figure S2. UV spectra, λ_{max} and retention time of the phenolic compounds **10** to **18** of the foliar tissues of 25 varieties of *Phaseolus vulgaris*.

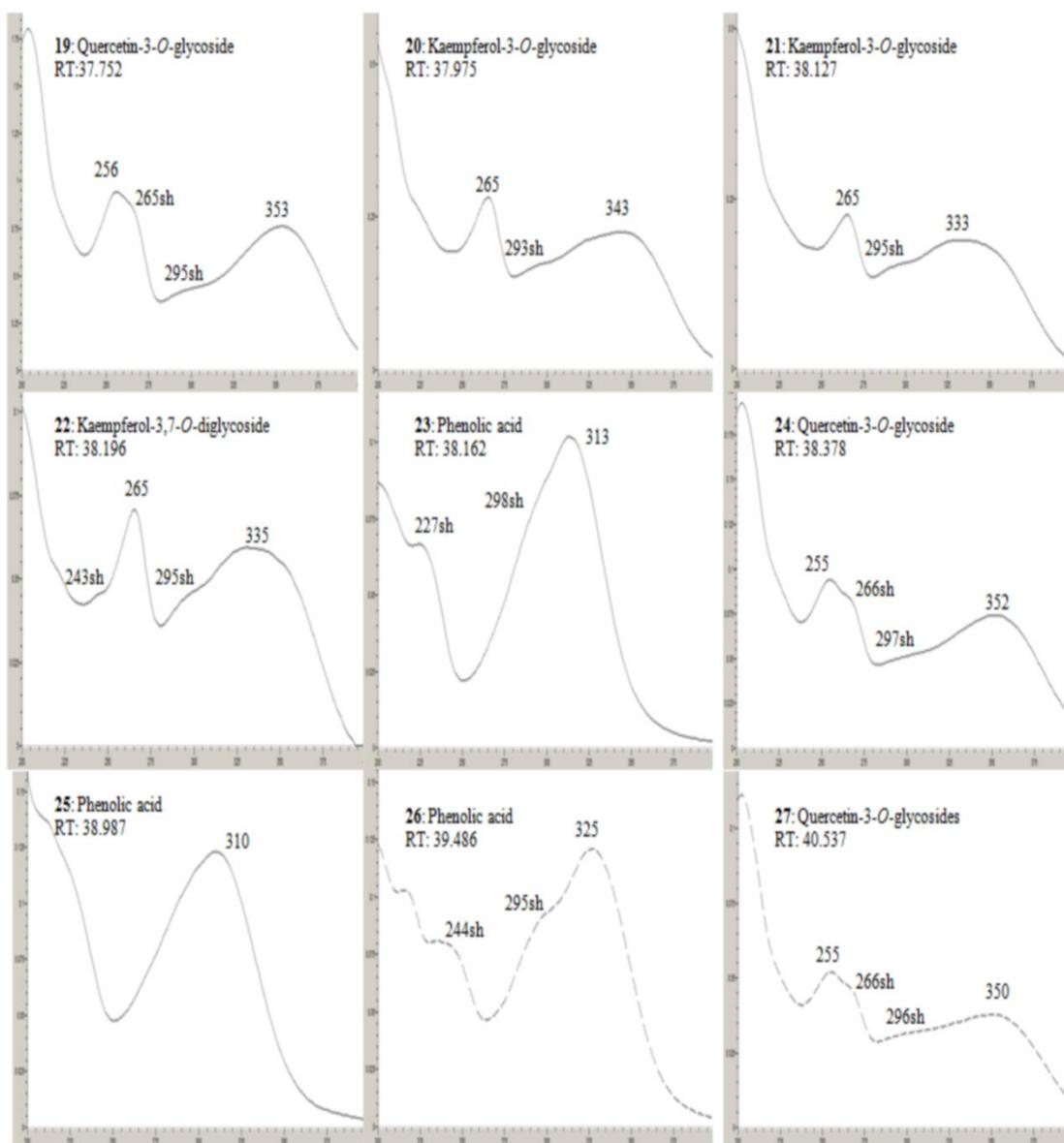


Figure S3. UV spectra, λ_{\max} , and retention time of the phenolic compounds **19** to **27** of the foliar tissues of 25 varieties of *Phaseolus vulgaris*.

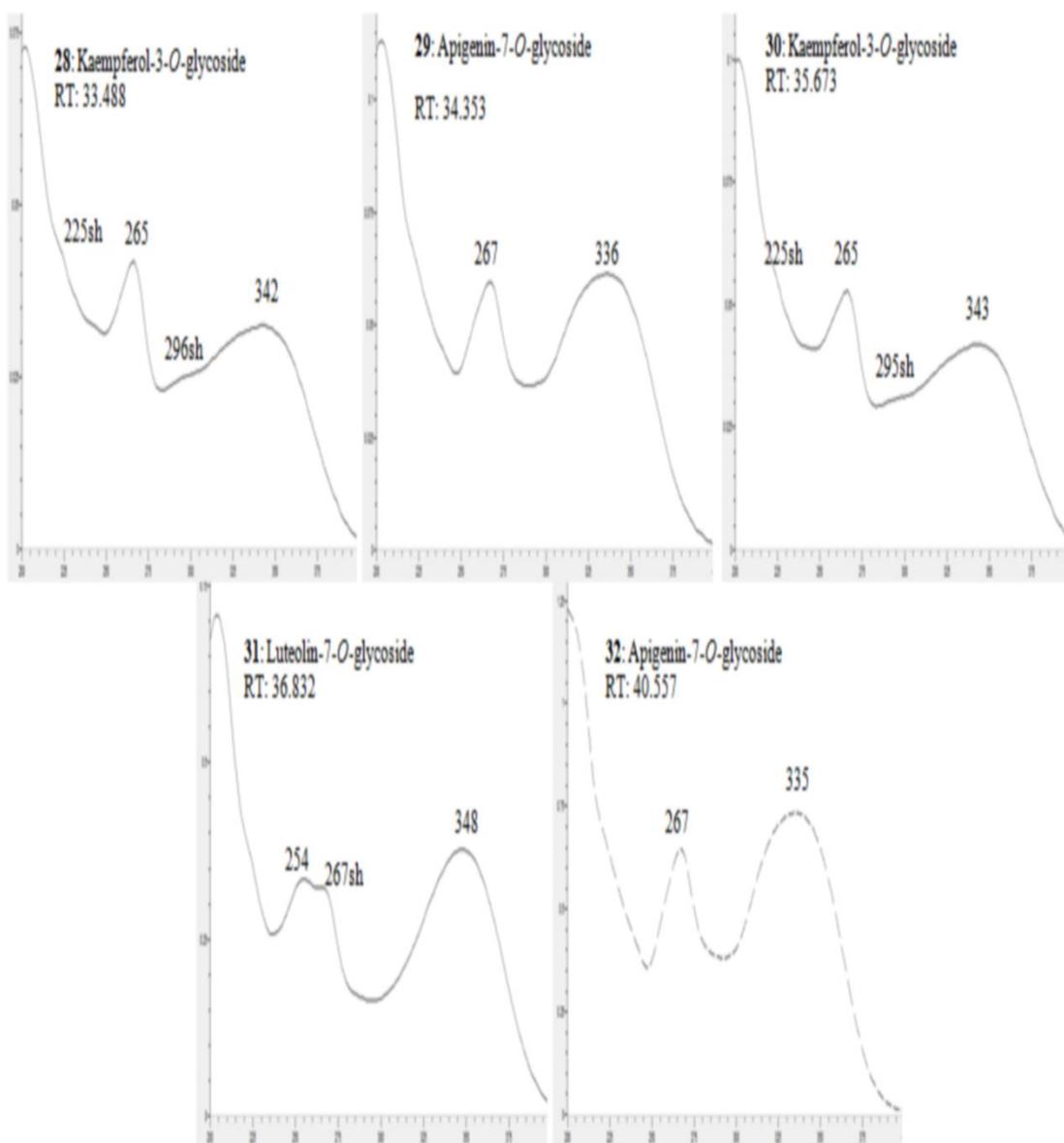


Figure S4. UV spectra, λ_{\max} and retention time of the phenolic compounds **28** to **32** of the foliar tissues of *Phaseolus coccineus*.

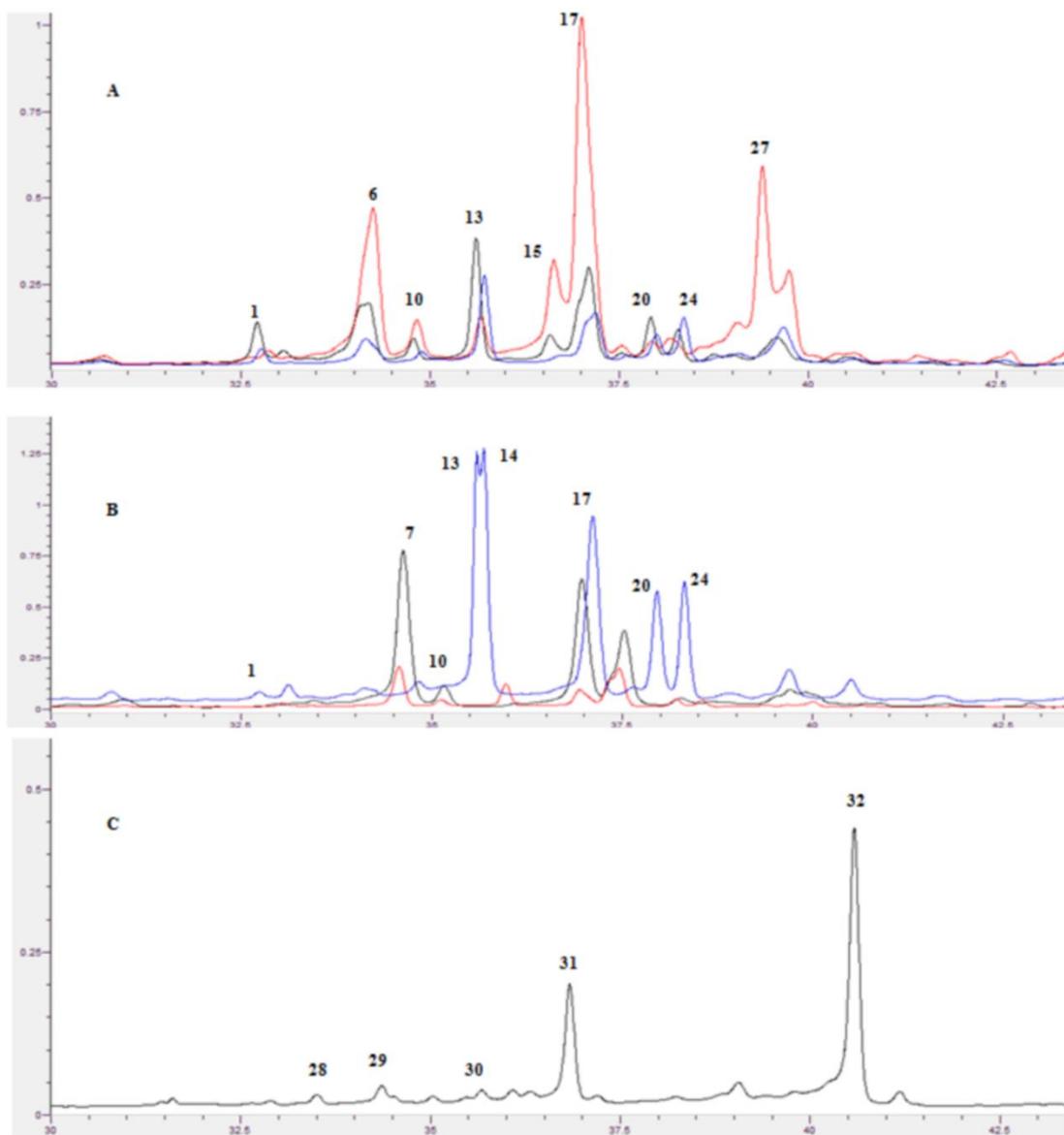


Figure S5. Foliar tissues HPLC-DAD profiles of six varieties of *Phaseolus vulgaris*. A: Canario Regional in red, Negro Vizcaya in black, Pinto Mestizo in blue; B: Flor de Junio in red, Azufrado Namiquipa in black, Pinto Bayacora in blue); C: *P. cocineus*. The number of compounds corresponds to Figures S1 to S4.

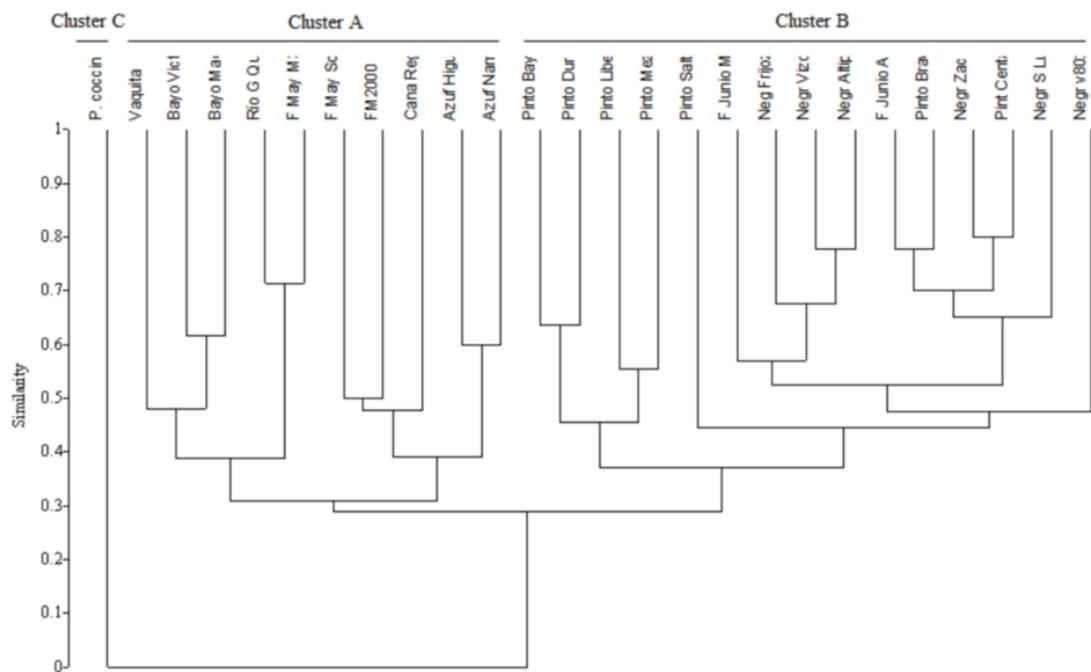


Figure S6. Results of cluster analysis comparing foliar phenol profiles for 25 varieties of *Phaseolus vulgaris*, and *P. coccineus*.



Figure S7. Seeds of the 25 cultivars of *Phaseolus vulgaris*, and *P. coccineus* analyzed in the present study. The variety registers are shown.