



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**DIVERSIDAD, ESTRUCTURA Y RELACIONES
GENÉTICAS DEL FRIJOL LIMA (*Phaseolus lunatus*
L. var. *lunatus*) EN EL ÁREA MAYA.**

Tesis que presenta

Luciana Camacho Pérez

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Opción Recursos Naturales

Mérida Yucatán, México. Mayo 2012



**CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN A.C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "DIVERSIDAD, ESTRUCTURA Y RELACIONES GENÉTICAS DEL FRIJOL LIMA (*Phaseolus lunatus* L. var. *lunatus*) EN EL ÁREA MAYA" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de los Dres. Jaime Martínez Castillo y Javier Orlando Mijangos Cortés, dentro de la Opción Maestría en Ciencias Biológicas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.

Mérida, Yucatán, México; a 22 de Mayo del 2012

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Nombre: Luciana Camacho Pérez

Dedicatoria

Dios, mis padres, mis hermanos, mi esposo me han brindado todo el apoyo para llegar hasta esta etapa, pero ahora existe un ser tan especial que me da más fuerzas y ánimos para seguir superándome... mi bebecito.

Esta tesis pasó por muchas adversidades y tanto mi padre Don Lino como mi mami Doña Lucy me alentaron a terminarla como debe ser, por lo tanto, ambos merecen mi más grato y profundo reconocimiento. Así como también les agradezco infinitamente por estar siempre a mi lado, apoyándome en mis decisiones, guiándome, aconsejándome, y más que nada por todo el AMOR que día con día me dan.

Así como también he recibido el apoyo de mis hermanos Juan, Pepe, Kike y Mike quienes en todo momento me han alentado a superarme académicamente y le dan sabor a mi vida. Junto con mis sobrinos Eros y Abraham que siendo pequeños me muestran lo grande de la vida con sus sonrisas.

Una persona que siempre estuvo ahí pero que hasta hace unos cuantos años conocí es Rubén, mi amigo, mi esposo y mi novio. Gracias por apoyarme en todo momento, por alentarme a concluir metas, por compartir tu vida conmigo, por compartir sueños, alegrías y muchas cosas más. TE AMO MI VIDA.

"No hay regalo más maravilloso que la vida de un hijo"
PARA: Saúl

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero otorgado.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán por las facilidades y el apoyo brindados para la realización de este trabajo en especial a la Unidad de Recursos Naturales.

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Jaime Martínez Castillo por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección, por las facilidades concedidas para la realización de este trabajo en el laboratorio.

Agradezco al Dr. Javier O. Mijangos Cortes por la dirección en este proyecto de tesis.

Quiero agradecer al técnico Julián Coello Coello por su asesoría en el laboratorio, consejos y ayuda necesaria en el desarrollo de este trabajo.

A mi comité tutorial el Dr. Jaime Martínez, Dr. Javier Mijangos, Dr. Jean Pierre Baudoin y la Dra. Patricia Colunga por sus comentarios durante la realización de los tutoriales.

A los profesores que contribuyeron de manera importante en la revisión de la tesis: Dra. Miriam Ferrer, Dr. Jean Pierre Baudoin, Dra. Ivonne Sánchez del Pino y Dra. Patricia Colunga.

A mis compañeros del laboratorio de Marcadores Moleculares, compañeros del posgrado y de la Unidad de Recursos Naturales.

ÍNDICE GENERAL	PÁGINA
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I	5
INTRODUCCIÓN	5
MARCO TEÓRICO	8
Diversidad, erosión genética y conservación	8
Marcadores genéticos	10
El frijol Lima (<i>Phaseolus lunatus</i> L.)	11
Mesoamérica y el área Maya	16
Estudios de diversidad genética en <i>P. lunatus</i> var. <i>lunatus</i>	24
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	28
Objetivo general	28
Objetivos específicos	28
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	29
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
CAPÍTULO II. DIVERSIDAD, ESTRUCTURA Y RELACIONES GENÉTICAS DEL ACERVO CULTIVADO MESOAMERICANO DE <i>P. lunatus</i> var. <i>lunatus</i> EN EL ÁREA MAYA	39
INTRODUCCIÓN	39
MATERIALES Y MÉTODOS	41
Área de estudio	41

	PÁGINA
Material vegetal	42
Extracción de ADN	42
Técnica de ISSR	45
ANÁLISIS DE DATOS	46
Diversidad genética	46
Estructura genética	47
Relaciones genéticas	47
RESULTADOS	47
Diversidad genética	47
Estructura genética	49
Relaciones genéticas	50
DISCUSIÓN	52
Diversidad genética	52
Estructura genética	54
Relaciones genéticas	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
CAPÍTULO III. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES	63
PERSPECTIVAS	65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

ÍNDICE DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1.1. Distribución de los acervos genéticos primarios de <i>P. lunatus</i> L., el acervo genético Mesoamericano (A.G.M., suroeste de Estados Unidos – Argentina) y el acervo genético Andino (A.G.A., Colombia – sur de Brasil); cv-gr (cultigrupo; Modificado de Gutiérrez <i>et al.</i> , 1995)	14
Figura 1.2. Mapa geográfico del área cultural Maya, dividido en Tierras Bajas y Tierras Altas (Garza <i>et al.</i> , 1996)	17
Figura 1.3. Distribución de la altura media sobre el nivel del mar en el Área Maya (Morley, 1983)	18
Figura 1.4. Lingüística del Área Maya. Mapa geográfico del área de las lenguas mayas (Garza <i>et al.</i> , 1996)	22
Figura 2.1. Distribución geográfica de las accesiones del acervo cultivado mesoamericano de <i>P. lunatus</i> colectadas en el área cultural Maya empleadas en este estudio.	43
Figura 2.2. Representación del programa de amplificación. a) pre-desnaturalización, b) desnaturalización, c) alineamiento, d) extensión, e) extensión final, f) mantenimiento del producto de amplificación.	46
Figura 2.3. Dendrograma (UPGMA) de las relaciones genéticas de 46 accesiones del área Maya del acervo cultivado Mesoamericano de <i>P. lunatus</i> , usando 75 loci de ISSR.	51

ÍNDICE DE CUADROS	PÁGINA
Cuadro 1.1. Cronología de la cultura Maya (Tomás, 2011, comunicación personal).	19
Cuadro 2.1. Ubicación geográfica de 23 accesiones del acervo cultivado mesoamericano de <i>P. lunatus</i> incluidas en el estudio de diversidad, estructura y relaciones genéticas de la subárea de las Tierras Altas (*) y las Tierras Bajas (*).	44
Cuadro 2.2. Características de los cuatro iniciadores ISSR's usados en el análisis de la diversidad, estructura y relaciones genéticas en el área Maya.	45
Cuadro 2.3. Mezcla de reacción para PCR	45
Cuadro 2.4. Estimadores de diversidad genética del acervo cultivado de <i>P. lunatus</i> del área Maya usando 75 loci ISSR.	48
Cuadro 2.5. Estimadores de diversidad genética aplicados a las accesiones del acervo cultivado mesoamericano de <i>P. lunatus</i> de las Tierras Bajas mayas, usando 75 loci ISSR.	48
Cuadro 2.6. Estimadores de diversidad genética aplicados a las accesiones del acervo cultivado mesoamericano de <i>P. lunatus</i> de las Tierras Altas mayas, usando 75 loci ISSR.	49
Cuadro 2.7. Estimadores de estructura y flujo genético del acervo cultivado mesoamericano de <i>P. lunatus</i> del área maya, usando 75 loci ISSR.	50
Cuadro 2.8. Análisis molecular de varianza aplicado al acervo cultivado mesoamericano de <i>P. lunatus</i> del área Maya usando 75 loci ISSR.	50

RESUMEN

Entre las principales especies domesticadas del género *Phaseolus* y de gran importancia se encuentra el frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L.). Esta se conforma de dos acervos genéticos: el Mesoamericano y el Andino. Para el acervo Mesoamericano se ha demostrado que la península de Yucatán posee el mayor número de formas cultivadas de todo México con una alta diversidad genética. Diversos estudios morfológicos y moleculares han señalado el alto riesgo de erosión genética en este germoplasma debido, principalmente, a cambios asociados a la intensificación de la agricultura tradicional. El objetivo de este trabajo fue analizar la diversidad, estructura y relaciones genéticas del acervo cultivado mesoamericano del frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L. var *lunatus*) del área maya, comparando los resultados obtenidos de cada subárea (Tierras Bajas Mayas vs Tierras Altas Mayas). El análisis se realizó en 23 poblaciones de cada área y se analizaron 73 loci ISSRs (Inter-Simple Sequence Repeats). Los resultados indican que las Tierras Altas presentan niveles mayores de diversidad genética que las Tierras Bajas (Porcentaje de loci polimórfico = 100 y 97.33%, respectivamente; Índice de Shannon = 0.58 y 0.51, respectivamente). El análisis de estructura mostró que existe una diferenciación genética muy grande en el área Maya ($F_{st} = 0.66$) y niveles bajos de flujo genético ($Nm = 0.29$). En el análisis de relaciones genéticas las accesiones presentaron un patrón general de agrupamiento basado en las dos subáreas Mayas. Los resultados aquí presentados son importantes para implementar estrategias en la colecta y conservación *ex situ* de las variedades cultivadas de *P. lunatus* en el área Maya.

ABSTRACT

Among the major domesticated species of the genus *Phaseolus* and most important is the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). This specie is granped into two gene pools: the Mesoamerican and Andean. For the Mesoamerican pool, it has been showed that the Yucatan Peninsula has the largest number of cultivated forms from all over Mexico , displayed a high genetic diversity. However, several studies indicate a high risk of genetic erosion in this gene pool due to changes associated with the intensification of traditional agriculture. The objective of the work was to analyze the genetic diversity, the structure and genetic relationships of the Mesoamerican cultivated forms *P. lunatus* present in the Mayan Highlands and Lowlands. 23 accessions for each area were included and 73 ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) loci were analyzed. The genetic diversity analysis indicated that higher values were observed in the Highlands with a Shannon index of 0.58 and polimorphic loci percentage value of 100% versus 0.51 and 97.33% for the same parameters respectively in lowlands. The structure analysis revealed a high genetic differentiation in the Mayan area ($F_{st} = 0.66$) with low levels of gene flow ($Nm = 0.29$). In the analysis of genetic relationships the accessions showed a general clustering pattern based on the existence of these two Mayan sub-areas. These results are important as they are the base for the implementation of a collect and ex situ conservation strategies of the cultivated *P. lunatus* in the Mayan area.

INTRODUCCIÓN

México es un centro importante de domesticación y de diversidad de numerosos cultivos, entre los que se encuentra el frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L.) el cual, después del frijol común (*P. vulgaris* L.), es la segunda leguminosa cultivada más importante del género *Phaseolus* (L.; Martínez, 2005).

De acuerdo a Baudet (1977), *P. lunatus* está conformada por dos variedades botánicas: *P. lunatus* var. *lunatus* (formas cultivadas) y *P. lunatus* var. *silvester* (formas silvestres). Para las formas cultivadas este autor basándose en la morfología de las semillas identificó tres cultigrupos (cv-grs.): 1) Papa, 2) Sieva y 3) Gran Lima. Adicionalmente, *P. lunatus* está integrada por dos principales acervos genéticos (Fofana *et al.*, 1997; Maquet *et al.*, 1997; Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995; Nienhuis *et al.*, 1995): el acervo genético Andino y el acervo genético Mesoamericano, ambos comprenden tanto formas silvestres como cultivadas. Las formas cultivadas del acervo genético Andino se distribuyen desde Colombia hasta el Sur de Brasil y comprenden el cv-gr. Gran Lima. El acervo genético Mesoamericano se extiende desde el Suroeste de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina y está representado por los cv-grs. Papa y Sieva (Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995; Makie 1943; Vavilov 1926).

Una importante área cultural que forma parte del área de distribución del acervo genético Mesoamericano de *P. lunatus* es el área Maya. Esta cultura se extendió en un territorio de aproximadamente 400 000 km², abarcando los actuales estados mexicanos de Tabasco, Chiapas, Campeche, Yucatán y Quintana Roo, y hacia Centroamérica hasta el occidente de Honduras y El Salvador, incluyendo Belice y Guatemala. El área Maya incluye una variedad de ecosistemas: paisajes de alta montaña, áreas costeras, bosques de niebla, regiones de selvas altas, medianas y bajas, y zonas lacustres e inundables. La gran diversidad de hábitats encontrados en esta área permite dividirla en dos zonas: Tierras Altas y Tierras Bajas (Ruz, 1981). Las Tierras Altas comprenden el estado mexicano de Chiapas, el país de Guatemala (exceptuando al departamento del Petén), el occidente de Honduras y el occidente de El Salvador. Las Tierras Bajas comprenden los

estados mexicanos de Campeche, Yucatán, Quintana Roo y Tabasco, el país de Belice y el departamento del Petén Guatemalteco.

En el área Maya, las formas cultivadas de *P. lunatus* son importantes en la agricultura tradicional en donde reciben diferentes nombres: "lb" para toda el área de las Tierras Bajas, "Ixtapacal" para Guatemala y "Patashete" para Chiapas, entre otros nombres (Ballesteros, 1999). Un caso muy bien estudiado de la importancia de este cultivo es el de la península de Yucatán en México, región que abarca la mayor parte de las Tierras Bajas Mayas y que está incluida en el área putativa de domesticación del acervo genético Mesoamericano de *P. lunatus* (Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995; Vavilov, 1926). En esta región, esta especie es el cuarto cultivo más importante dentro de la milpa, solamente después del maíz (*Zea mays* L.), el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y la calabaza (*Cucurbita* spp. L.) (Martínez-Castillo *et al.*, 2004). La milpa es un sistema de agricultura tradicional que ha sobrevivido por siglos debido, en parte, a la resistencia cultural ofrecida por los pueblos Mayas quienes han mantenido a este sistema agrícola como la base material de su cultura y alimentación, asimismo, la presencia de grandes extensiones de suelos rocosos y poco profundos han limitado la introducción de: maquinaria agrícola, otros cereales y siembra al voleo (Zizumbo-Villarreal, 1992).

Durante las últimas décadas, la milpa de las Tierras Bajas Mayas ha sufrido una serie de transformaciones que están poniendo en crisis la existencia de la diversidad genética de las especies cultivadas en este sistema agrícola, esto debido, en parte, al crecimiento de la población rural, la cual se ha elevado al doble en los últimos 30 años (Cuanalo y Arias, 1997). Entre los cambios más notorios en la intensificación de la milpa se encuentran: a) el acortamiento en el período de barbecho (tiempo de descanso de las tierras agrícolas), cuyo tiempo óptimo ha sido calculado para la región en aproximadamente 20 años (Lazos, 1995; Ku-Naal, 1995; Hernández-Xolocotzi, 1981), b) la integración de los productores a un sistema de mercado, c) el mayor uso de agroquímicos, d) la disminución de la diversidad inter e intraespecífica de las especies cultivadas y e) la pérdida de áreas de vegetación aledañas a las milpas donde se desarrollan las poblaciones silvestres de muchos de los cultivos (Graefe, 2003; Terán y Rasmussen, 1995; Reyes y Aguilar, 1992).

Aún con todos los cambios que ha sufrido la milpa Maya, Ballesteros (1999) demostró que la península de Yucatán contiene la mayor cantidad de formas cultivadas de *P. lunatus* de todo México. Esto fue confirmado por Martínez-Castillo *et al.* (2004). Estos últimos autores señalaron también que existe un alto riesgo de pérdida de variedades locales de esta especie ya que muchas de éstas son sembradas por un número pequeño de campesinos y en áreas de terreno pequeñas. En un análisis molecular usando secuencias inter microsatélites (ISSRs), Martínez-Castillo *et al.* (2008) demostraron que, aún bajo este riesgo de erosión genética, el acervo genético cultivado del frijol Lima presente en esta región posee niveles altos de diversidad genética en comparación a otras regiones de América.

Considerando la alta diversidad genética de las formas cultivadas de *P. lunatus* manejada en la agricultura tradicional de las Tierras Bajas Mayas, el alto riesgo de erosión genética que éstas presentan y la carencia de trabajos que abarquen toda el área Maya, surge la necesidad de realizar estudios que nos permitan determinar con mayor precisión la importancia de esta área como centro de diversidad genética dentro del acervo cultivado Mesoamericano de *P. lunatus*. La realización de este tipo de estudios no sólo permitirá conocer la diversidad, estructura y relaciones genéticas de las formas cultivadas de *P. lunatus* en esta importante área cultural, también ayudará a valorar el papel de la agricultura tradicional y la aportación de los grupos étnicos (en particular la cultura Maya) como generadores y conservadores de dicha diversidad. Además, este tipo de estudios nos permitirá tener más elementos para generar los conocimientos básicos sobre la adecuada implementación de programas de conservación en esta región de Mesoamérica.

MARCO TEÓRICO

DIVERSIDAD, EROSIÓN GENÉTICA Y CONSERVACIÓN

El término diversidad biológica, o biodiversidad, no solamente consiste en el número de especies de plantas, animales, etc., sino que, en su sentido más amplio incluye la diversidad genética dentro de una especie, entre especies y entre ecosistemas. La diversidad biológica presente es el resultado de miles de millones de años de evolución, modificada por procesos naturales e influenciada cada vez más por las actividades humanas (CONABIO, 2007). La diversidad biológica es un recurso esencial para el bienestar humano ya que asegura recursos genéticos para la alimentación y la agricultura, por consiguiente constituye la base biológica de la seguridad alimentaria del mundo y el soporte del sustento humano (CONABIO-CONANP-SEMARNAT, 2008).

México posee una extraordinaria riqueza biológica, tanto a nivel genético como de variedad de especies y ecosistemas. Nuestro país se ubica entre los cinco primeros países de mayor biodiversidad (CONABIO, 2007; Sala *et al.*, 2000; Pimm *et al.*, 1995). Además, es un importante centro de domesticación y de diversidad de numerosos cultivos. Sin embargo, cambios demográficos, como la migración y el abandono de la agricultura al convertirse en una actividad económica poco rentable, afectan grandemente la diversidad de muchas de las especies nativas cultivadas (Bellon *et al.*, 2009). Esta pérdida de biodiversidad es conocida como erosión genética. A nivel de especies domesticadas, esta se puede definir como el proceso de pérdida o reducción de la diversidad genética dentro de las variedades cultivadas y sus poblaciones silvestres a través del tiempo (Jarvis *et al.*, 2000). En la agricultura, la erosión genética está provocando la desaparición de los recursos genéticos vegetales a un ritmo alarmante (tasa de erosión anual del uno al 2%), recursos de los cuales depende la seguridad alimentaria de las generaciones presentes y futuras (Demissie, 2000; Mazhar, 1997). Esta erosión es una consecuencia de la alteración en los sistemas arables, el uso de tierras no sustentable, la deforestación o el deterioro de los agroecosistemas. La erosión genética es un tema significativo en las áreas de domesticación de plantas debido a que éstas concentran una alta diversidad genética, se conservan las variedades ancestrales junto

con el conocimiento y las prácticas culturales que han creado esta diversidad y favorecen el flujo de genes entre los acervos silvestre y domesticado, su variabilidad genética es la base del desarrollo de variedades mejoradas y fuente de resistencia a factores ambientales adversos (Hernández, 2000; Bellon y Taylor, 1993; Brush, 1991).

El desarrollo del conocimiento multidisciplinario en áreas como la genética, la biología de la conservación, y la biogeografía, entre otras áreas del conocimiento, pueden determinar los métodos más adecuados para el mantenimiento de las especies y la dinámica de las comunidades y ecosistemas a través del tiempo (Cubillos, 1998). Por ejemplo: la ecología y los conocimientos tradicionales sobre los agroecosistemas han ayudado a la conservación de un gran número de especies domesticadas en México (Hernández-Xolocotzi, 1973). Por su parte, la biología de la conservación se enfoca en mantener activamente la diversidad genética de una especie, está dedicada a la preservación, rescate, mantenimiento, estudio y utilización del patrimonio que representa la biodiversidad (Tapia y Rosas, 1998). La conservación de especies puede realizarse en dos modalidades: *in situ* y *ex situ*. El Convenio de la Diversidad Biológica define que la conservación *in situ* “es la conservación, mantenimiento y recuperación de poblaciones viables en sistemas dinámicos y evolutivos del hábitat original o en el caso de especies cultivadas, en el entorno en que hayan desarrollado sus características”, esto permite que el germoplasma pueda continuar su proceso evolutivo. Por su lado, la conservación *ex situ* se define como “la conservación de muestras genéticamente representativas de las especies o cultivos, que se mantienen viables a través del tiempo, fuera de sus hábitats naturales o lugares de cultivo, en ambientes controlados y con el apoyo de tecnologías adecuadas” (Frankel y Soule, 1992).

Aunque muchas especies están siendo rescatadas por métodos *ex situ* y reintroducciones, la forma más importante de conservar una especie es a través de la protección del hábitat en el que se encuentra (Tapia y Rosas, 1998). La participación de las comunidades locales en la conservación *in situ* es la figura que se promueve a nivel internacional, debido a su dominio sobre los territorios y a los conocimientos tradicionales que mantienen en torno al uso y manejo de los recursos naturales (Hoyt, 1988).

MARCADORES GENÉTICOS

Una estrategia en el estudio de la diversidad genética en las especies cultivadas es el uso de marcadores genéticos. Un marcador genético es un carácter cuantificable que puede detectar variación ya sea en una proteína o en una secuencia de ADN. Una diferencia, ya sea fenotípica o genotípica, puede actuar como marcador genético si identifica en un individuo características del genotipo, del fenotipo, o de ambos y si, además, puede hacerse seguimiento a su herencia a través de varias generaciones (IPGRI y Cornell University, 2003). Los marcadores genéticos se dividen en tres tipos: a) morfológicos, b) proteicos o bioquímicos y c) moleculares (IPGRI y Cornell University, 2003).

Los marcadores moleculares son secciones del genoma, generalmente muy pequeñas en comparación con el genoma completo de un organismo, los cuales son elegidos con el objetivo de que sean representativos de las cadenas más largas de ADN (Trevor y Rowe, 2007); son ampliamente utilizados en genética humana, vegetal, animal y microbiana y permiten evidenciar variaciones (polimorfismos) en la secuencia del ADN entre dos individuos, modifiquen éstas o no su fenotipo (Picca *et al.*, 2004).

Según Caetano-Anollés y Gresshoff (1997) los marcadores moleculares se clasifican de acuerdo al tipo de técnica en la que se basan: 1) hibridación (marcadores RFLP: Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción), y 2) la tecnología de la PCR (marcadores RAPDs: polimorfismos de ADN amplificados al azar; AFLPs: polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados; minisatélites; SSR: secuencias simples repetidas o Microsatélites; ISSRs: Intersecuencia Simple Repetida, entre otros).

Una de las técnicas que ha sido útil en el estudio de la diversidad genética es la técnica molecular de los ISSRs. Esta se basa en el uso de un iniciador compuesto de una secuencia de microsatélite anclado al extremo 3' ó 5' por 2 – 4 nucleótidos arbitrarios y a menudo degenerados (Deqiu *et al.*, 1998). Las bandas que se obtienen con este tipo de marcador van de 100 a 2000 pares de bases (pb). La variación alélica en los ISSRs consiste de la presencia o ausencia de los productos amplificados. Este es un tipo de marcador dominante el cual genera de 25 a 50 bandas en una sola reacción, por lo cual

pueden distinguir accesiones relacionadas muy estrechamente de forma más confiable que otras técnicas y son menos caros que los RFLP ó los RAPD (Deqiu *et al.*, 1997; Zietkiewicz *et al.*, 1994). Los ISSR han sido utilizados en especies cultivadas desde 1994 y pueden utilizarse para la identificación de individuos, distinción de variedades intraespecíficas, identificación de paternidad y maternidad, mapeo genético, evaluación de diversidad genética y subdivisión genética en poblaciones, reconstrucciones filogenéticas, introgresión e hibridación (Wolfe *et al.*, 1998).

Entre las ventajas principales que ofrecen los ISSR están la alta variación que detecta, su reproducibilidad debida principalmente a las altas temperaturas de alineación utilizadas en la PCR, no son necesarias altas concentraciones de ADN, no es necesario conocer la secuencia del genoma del organismo en estudio y pueden visualizarse tanto en electroforesis de geles de agarosa como de acrilamida. Entre las limitaciones de los ISSRs están: que las bandas son leídas como marcadores dominantes, es decir, la presencia de la banda representa el genotipo dominante (homócigo o heterócigo), mientras que su ausencia representa el genotipo homócigo recesivo por lo que la homología de las bandas es incierta; dado que son marcadores dominantes, no permiten el cálculo de ciertos parámetros que exigen distinguir claramente a los heterócigos de los homócigos dominantes (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Asimismo, para estimar la heterocigosis poblacional es necesario asumir *a priori* que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, por lo que las estimaciones de heterocigosis y estructuración genética pueden sesgarse un poco, aunque existen correcciones estadísticas (Lynch y Milligan, 1994).

EL FRIJOL LIMA (*Phaseolus lunatus* L.)

Es una leguminosa de origen neotropical (Baudoin, 1988) y representa, después del frijol común (*P. vulgaris* L.), la segunda especie cultivada más importante del género *Phaseolus*. Actualmente, el frijol Lima se cultiva en América, en algunas regiones de Europa, África y Asia (Domínguez *et al.*, 2002).

Capítulo I

De acuerdo a Flores (2001) su clasificación taxonómica es la siguiente:

Familia : Fabaceae (Leguminosae)

Género : *Phaseolus* L.

Especie : *P. lunatus* L.

Subespecie: *P. lunatus* L., var. *silvester* (Baudet, 1977)

P. lunatus L., var. *lunatus* (Baudet, 1977)

Phaseolus lunatus es una herbácea con ciclo de vida anual o corto. La autogamia es favorecida por la maduración sincronizada de los granos de polen y el estigma, así como por la proximidad de éstos dentro de la yema floral (Webster *et al.*, 1979). Sin embargo, se han reportado tasas de entrecruzamiento que van del 0.02% hasta el 48%, dependiendo esto del genotipo, condiciones de crecimiento, distancia entre plantas, dirección del viento y las poblaciones locales de insectos polinizadores (Zoro Bi *et al.*, 2005; Baudoin *et al.*, 1998).

De acuerdo a Ballesteros (1999), *Phaseolus lunatus* recibe diferentes denominaciones con respecto al tamaño de la semilla. Para los cultivares de semilla pequeña (peso de 24-70 g por 100 semillas) los nombres comunes son, en lengua Maya "lb" (Yucatán, México), "patashete" (Chiapas, México), "ixtapacal" (Suchitepéquez, Guatemala); castellano: "sieva", "comba" (Guerrero, Colombia), "furuna" (Jalapa, México), "chilipuca" (El Salvador), "kedeba" (Costa Rica), "frijol caballero" (Cuba), "haba" (Puerto Rico, Panamá), "carauta" [Colombia (Atlántico)], "frijol de año" [Colombia (Tolima)], "guaracaro" (Venezuela); francés: "pois souche" (Haití).

Los nombres comunes de los cultivares de semilla grande (peso de 54-280 g por 100 semillas) son en castellano: "lima" (en razón de su proveniencia de la costa del Perú), "torta" [Colombia (Nariño, Huila), "layo" [Perú (Cajamarca)], "pallar" [Perú (Lambayeque, La Libertad, Lima, Ica y algunas partes de la sierra)], "palato" [Bolivia (Chuquisaca)], "poroto" "manteca" (Argentina).

Se han propuesto varias hipótesis para el origen de *P. lunatus*. La primera de éstas fue propuesta por Mackie (1943) quien fue el primero en proponer un origen específico para esta especie. Este autor propuso a Guatemala como el centro de origen del frijol Lima y señaló tres líneas principales de dispersión de las formas cultivadas, siguiendo las rutas de comercialización existentes en tiempos precolombinos: (1) la rama Hopi, que se extiende hacia el norte y alcanza áreas del sur de Estados Unidos, (2) la rama Caribe, la cual alcanza las islas del mar Caribe y la base del Amazonas en Brasil y, (3) la rama Inca, que abarca desde Centroamérica hasta Perú. Una hipótesis más reciente señala que esta especie se originó en Sur América, considerando las relaciones más estrechas con sus parientes andinos silvestres (Fofana *et al.*, 1999).

De acuerdo a una gran cantidad de evidencia morfológica, bioquímica y molecular existente, actualmente se reconoce que el acervo genético primario de *P. lunatus* está compuesto de dos grandes grupos genéticamente bien diferenciados, así como de un acervo genético secundario compuesto por especies silvestres de distribución Sur Americana las cuales son: *P. augusti* (Harms), *P. bolivianus* (Piper) y *P. pachyrhizoides* (Harms; Fofana *et al.*, 1999). Los dos grandes grupos presentes en *P. lunatus* son los llamados acervo genético Mesoamericano y acervo genético Andino, los cuales comprenden tanto la forma silvestre (*P. lunatus* var. *silvester*) como la domesticada (*P. lunatus* var. *lunatus*; Baudet, 1977). La evidencia morfológica, bioquímica y molecular sustenta el agrupamiento de los acervos mencionados (Fofana *et al.*, 1997; Maquet *et al.*, 1997; Lioi, 1996; Gutiérrez *et al.*, 1995; Nienhuis *et al.*, 1995). Las formas silvestres del acervo Mesoamericano se extienden desde el Norte de México hasta Argentina (Fig. 1.1), las semillas son de tamaño relativamente menor en comparación a su contraparte andina. La diferenciación genética entre los acervos Mesoamericano y Andino en las variantes silvestres se ve apoyada por estudios de: faseolina (Lioi, 1996), proteínas de semilla tipo lectinas (Lioi *et al.*, 1999), proteínas de almacenamiento en la semilla (Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995), aloenzimas (Maquet *et al.*, 1997) y marcadores moleculares RAPD (Fofana *et al.*, 1997), entre otros. En lo que respecta a las formas cultivadas, el acervo genético Mesoamericano se extiende desde el Suroeste de Estados Unidos hasta Argentina (Fig. 1.1), caracterizado por semillas de tamaño pequeño (0.24-0.70 g/semilla) y representado por el cv-gr Sieva de semilla con forma arriñonada de tamaño intermedio y el cv-gr. Papa con semillas de forma globular de tamaño pequeño. El acervo genético Andino se

distribuye desde Colombia hasta el Sur de Brasil, las semillas son de forma arriñonada de gran tamaño (mayores a 0.54 g/semilla) y es representado por el cv-gr. Gran Lima (Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995; Geps, 1990).

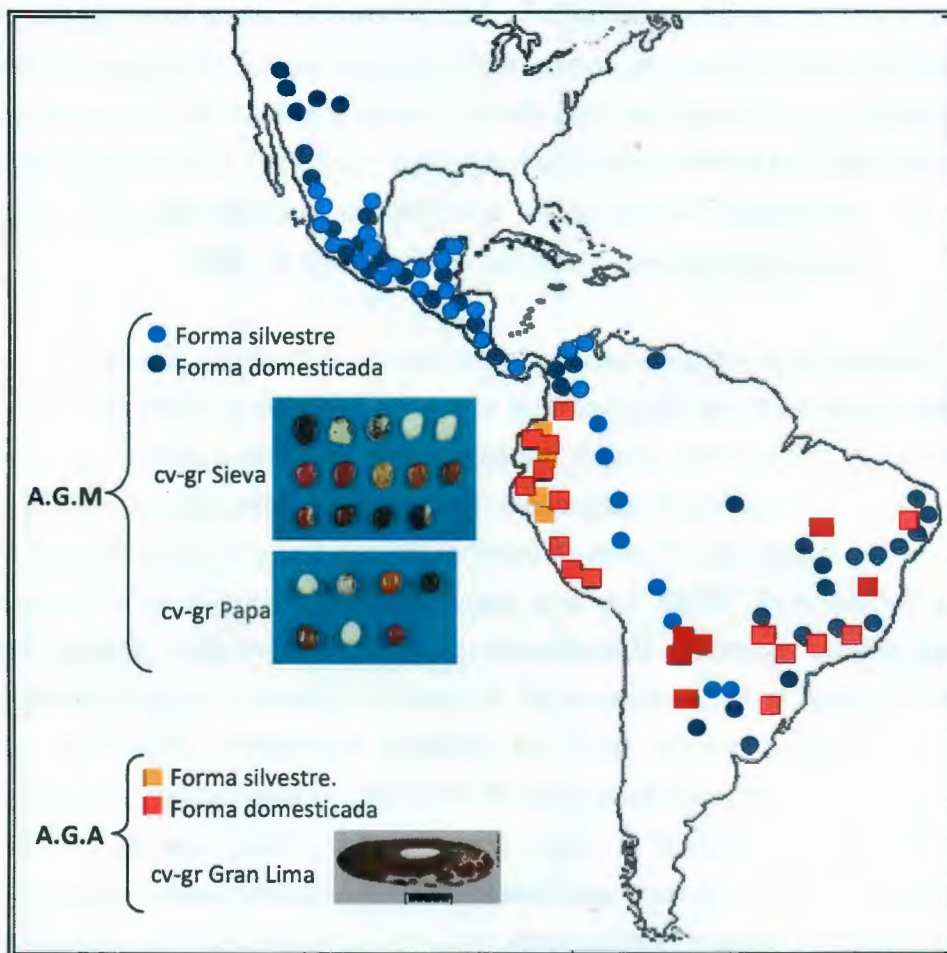


Figura. 1.1. Distribución de los acervos genéticos primarios de *P. lunatus* L., el acervo genético Mesoamericano (A.G.M., suroeste de Estados Unidos – Argentina) y el acervo genético Andino (A.G.A., Colombia – sur de Brasil); cv-gr (cultigrupo) (Modificado de Gutiérrez *et al.*, 1995).

Diferentes investigadores han tratado de localizar el centro de domesticación de *P. lunatus*. La teoría más aceptada, basada en datos arqueológicos (Kaplan y Linch, 1999; Kaplan y Kaplan, 1988), evolutivos (Smartt, 1985), bioquímicos (Lioi, 1996, 1994; Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995) y moleculares (Fofana *et al.*, 1997), apoyan la hipótesis de

dos eventos de domesticación independientes en los dos acervos genéticos de la especie. La evidencia arqueológica reportada por autores como Kaplan y Lynch (1999) y Kaplan y Kaplan (1988) apoyan la hipótesis que variantes de semillas pequeñas (cv-gr Sieva y Papa) fueron domesticadas en Mesoamérica, mientras que las formas de semilla grande (cv-gr Gran Lima) fueron domesticadas en Sudamérica. Dicha evidencia también señala que *P. lunatus* fue primero domesticado en Sudamérica alrededor de los 5000 años A. P. como lo demuestra la edad de las semillas fosilizadas encontradas en diferentes lugares del Perú. La domesticación de las formas mesoamericanas ocurrió al parecer mucho tiempo después, ya que los registros arqueológicos más antiguos para esta especie encontrados en Mesoamérica datan de 1500 años A. P. en las cuevas de Ocampo, en Tamaulipas; o de 1300 A. P. en el Río Zape, Durango.

Gutiérrez-Salgado *et al.* (1995) proporcionaron evidencia bioquímica que apoya la hipótesis de una domesticación independiente. Sus resultados muestran que las formas silvestres se dividen en dos grupos: uno con semillas pequeñas distribuidas en México, Centroamérica y el Este de los Andes y otro con semillas grandes con distribución más limitada en el Oeste de los Andes en Ecuador y Norte de Perú. Así como también las cultivadas de semilla grande se han domesticado de semillas silvestres grandes de frijol Lima en el Oeste de Sudamérica. En su estudio, estos autores no lograron determinar un centro de domesticación para las formas cultivadas de semilla pequeña ya que la variante del patrón electroforético comúnmente compartido por las formas silvestres y cultivadas presenta una amplia distribución geográfica (desde México hasta Argentina).

Los resultados obtenidos por Fofana *et al.* (1997) a partir del uso de RAPD's apoyan la hipótesis de domesticación independiente dentro de cada acervo genético de *P. lunatus*. Estos autores encontraron que las accesiones silvestres y cultivadas pertenecientes al mismo acervo genético compartían una mayor similitud genética entre sí, que la compartida con las poblaciones silvestres o cultivadas del otro acervo genético.

MESOAMÉRICA Y EL ÁREA MAYA

Mesoamérica constituye una de las 25 Ecorregiones Terrestres Prioritarias (ETP) del mundo con mayor riqueza en biodiversidad (Mittermeir *et al.*, 1999). Es un área cultural y geográfica que comprende los siguientes países: en México, una porción del norte, y el centro y sur completos; Guatemala, Belice, El Salvador, Honduras, Nicaragua y Costa Rica (Acuña, 1980). Mesoamérica limita al norte en términos generales con el paralelo 24° latitud norte, y por las costas se prolonga hasta el paralelo 25° en la del Golfo, y hasta el paralelo 26° latitud norte en la del pacífico. Por el sur confina con el Océano Pacífico; en el sureste comprende toda la Península Yucateca, incluyendo Belice; Guatemala, el Oeste de Honduras, El Salvador y Nicaragua, y la parte oeste de Costa Rica hasta el Golfo de Nicoya (Canto, 1993).

Los arqueólogos han identificado a Mesoamérica como un área ocupada por una variedad de culturas antiguas que compartieron sus creencias religiosas, el arte, la arquitectura y la tecnología, aspectos que los hicieron únicos en América por más de tres mil años, desde aproximadamente 3000 a.C. hasta 1519 d.C. (Sharer, 1999). Esta ha sido dividida en cinco zonas culturales: 1) El occidente de México, 2) El altiplano central mexicano, 3) El Golfo de México, 4) El área de Oaxaca y 5) El área Maya (Matos, 2000; Escalante 1993).

La cultura Maya ocupó una gran extensión territorial calculada en más de 400,000 km² (Drew, 2002; Fig. 1.2), comprendiendo los países de Guatemala, Belice, El Salvador y la porción occidental de Honduras; en México la totalidad de los estados de Quintana Roo, Yucatán y Campeche, así como los estados de Tabasco y Chiapas. El área Maya incluye una variedad de ecosistemas que van desde alta montaña hasta áreas costeras: tal diversidad en el tipo de hábitats permite dividir al área Maya en Tierras Altas y Tierras Bajas (Ruz, 1981).

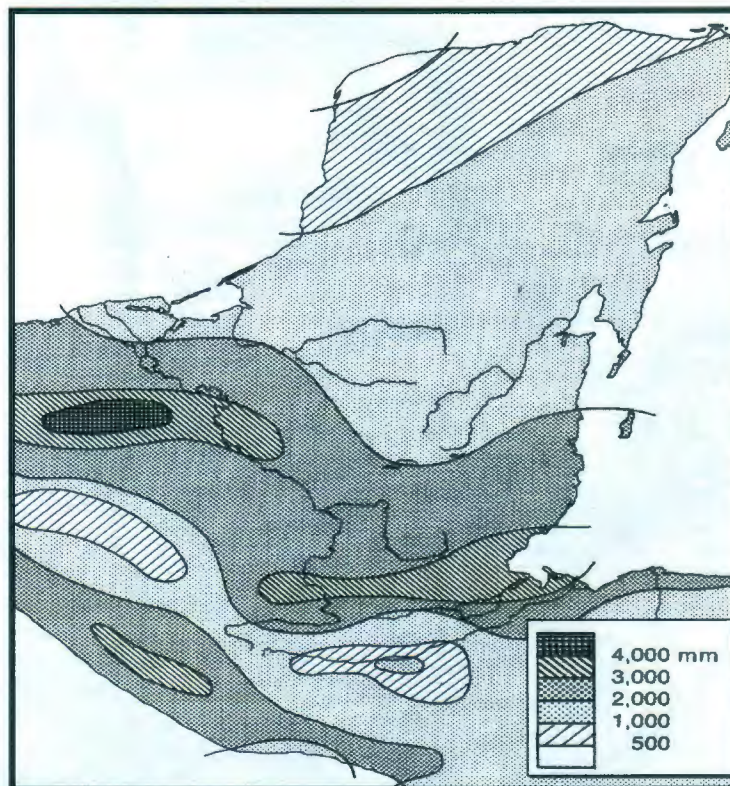


Figura 1.3. Distribución de la altura media sobre el nivel del mar en el área Maya (Morley, 1983)

Las Tierras Bajas comprenden los estados de Campeche, Yucatán, Quintana Roo, y Tabasco de México, el país de Belice y el departamento del Petén Guatemalteco (Sharer, 1999). De manera general el clima predominante es cálido subhúmedo con lluvias en verano, el rango de precipitación promedio anual va de 500 a 2,500 mm. Los rangos de temperatura promedio anual van de 24 a 28 °C (García, 1973). El relieve es plano con ligeras ondulaciones encontrando al sur terrenos de aproximadamente 400 msnm y al sureste terrenos que se elevan gradualmente desde la costa de Belice hasta la frontera con Guatemala sin alcanzar los 100 metros de altura. Siendo el Victoria Peak (1,132 m), el punto más alto (Fig. 1.3). La vegetación predominante es selva baja y mediana, los suelos son calcáreos y pedregosos (Daltabuit *et al.*, 2006; Carnevali *et al.*, 2003; Gargallo y Santana, 1993).

Los primeros humanos que ingresaron al área Maya fueron cazadores y recolectores. Instrumentos elaborados en piedra nos muestran los inicios de la colonización durante el Periodo Lítico (30,000 a 7,000 a.C.; Álvarez, 2004). De acuerdo con la datación léxico-estadística estos grupos humanos habían llegado a las Tierras Altas de Chiapas y Guatemala aproximadamente en 2500 a.C., dentro del periodo Arcaico y posiblemente fueron ellos quienes llevaron el maíz y otras plantas cultivadas a esta área (Coe, 1990).

Después del 2,000 a.C., se inicia el Periodo Preclásico que ha sido dividido en tres subperiodos: Temprano o Inferior, Medio y Tardío o Superior; éste último se prolongó hasta el siglo IV de nuestra era (Cuadro 1.1). El Preclásico Temprano se caracteriza por la adopción definitiva de la agricultura, cultivando maíz, frijoles, calabazas y chiles, que se convertirían en los cultivos Mayas básicos, la forma de vida sedentaria y la invención de la cerámica (Álvarez, 2004; Drew, 2002).

Cuadro 1.1. Cronología de la cultura Maya (Tomás, 2011, comunicación personal)

Sociedades urbanas y estatales	1550 d.C.	Posclásico Tardío	Estados en las Tierras Altas de Guatemala Esplendor y ocaso de Mayapán. Continuación de la escritura en códices
	1250 a.C.	Posclásico Temprano	Chichén Itzá. Cerámica plumiza. Uso de metales
	1000 d.C.	Epiclásico	Estilo arquitectónico Puuc. Cerámica anaranjada Fina. Últimos monumentos fechados
	800 d.C.	Clásico Tardío	Desarrollo de estilos regionales. Auge y estandarización de la escritura. Esplendor de la cerámica policroma.
	600 d.C.	Clásico Temprano	Consolidación de linajes gobernantes. Influencias Teotihuácanas. Cerámica policroma
	250 d.C.	Protoclásico	Escritura en altares y estelas. Primeras bóvedas. Cerámica Usulután.
	100 d.C.	Preclásico Tardío	Surgimiento de centros urbanos. Arquitectura monumental. Mascarones de estuco.
Agricultores aldeanos	500 d. C.	Preclásico Medio	Consolidación de la vida aldeana. Primeras vasijas cerámicas. Interacción con los olmecas
	1200 a.C.	Preclásico Temprano	Sedentarismo pleno. Cultivo de plantas. Alfarería.

Durante el lapso de 600 - 300 a.C. los principales asentamientos se localizaban en la costa de Pacífico de Guatemala y El Salvador. Así mismo, se inicia la ocupación

extensiva del centro del Petén (Álvarez, 2004). El preclásico tardío (500 a.C. - 100 d.C.), fue la época de cambios formativos, cuando se desarrolló el modelo básico de la civilización Maya. Surgieron ciudades tanto en las tierras altas como en las bajas (Drew, 2002).

Uno de los principales factores en el desarrollo de las poblaciones fue el ambiente natural el cual ofrecía una amplia gama de fuentes de alimento: peces, mariscos y fauna marina a lo largo de las costas así como en los lagos y ríos, mientras que de las selvas se obtenía una enorme variedad de alimentos vegetales silvestres y fuentes de proteína animal. Pero, a medida que las poblaciones crecían, una buena parte de los recursos de animales silvestres habían sido ahuyentados de la selva o reducidos en modo significativo por la cacería (Drew, 2002).

Aunque las Tierras Altas y las Tierras Bajas dependen de la quema de la vegetación y de los períodos de descanso de sus parcelas, son completamente diferentes entre ambas regiones. En las Tierras Altas la práctica de la agricultura en los suelos volcánicos fértiles sustentó asentamientos sustanciales. El barbecho moderado practicado depende de la posición del terreno en la ladera, con la posibilidad de 10 años de cultivo continuo en los campos más altos, después de lo cual la parcela debe dejarse descansar hasta 15 años, en tanto que predios más abajo es practicable el cultivo continuo durante 15 años, con sólo 5 años de descanso. Al sur, las tierras aluviales a lo largo de los ríos principales pudieron haber sido cultivadas de manera casi continua y los excedentes incluso pudieron ser exportados a otras áreas. En el transcurso del año se plantan varias clases de maíz y la labranza es por surcos, intercalando cosechas secundarias, como las de frijol, calabaza, mandioca y chile, aunque utiliza la misma clase de plantas que las Tierras Bajas, el sistema agrícola de la montaña parece estar bien adaptado a una zona muy poblada, con suelos fértiles y profundos, donde no es un gran problema la competencia de bosques muy tupidos o de la maleza (Drew, 2002; Coe, 1990).

Al norte en las tierras bajas la tierra es escasa, de tan sólo unos cuantos centímetros de profundidad. Sin embargo, en las áreas pantanosas próximas a algunos de los ríos de curso lento en Belice, se practicó el cultivo de camellones o terrenos

elevados. Los entornos contrastantes también significaban diversos recursos naturales o productos terminados que eran intercambiados por los de otras regiones. Redes de comercio, locales y de larga distancia, de artículos utilitarios y suntuarios, se extendían por todo el mundo Maya desde los tiempos preclásicos. El cacao o el chocolate, constituía un artículo comercial sumamente solicitado que sólo crecía en regiones con abundante precipitación pluvial, como las laderas más bajas arriba de la costa del Pacífico y los alrededores del golfo de Honduras (Drew, 2002).

Con respecto a la división entre tierras altas y tierras bajas del área Maya, corresponde al hecho de que existe una diferencia relativamente marcada entre casi todas las lenguas que se hablan en las tierras altas con respecto a las tierras bajas; esta diferenciación en dos grandes grupos se basa en la proximidad relativa de las lenguas al interior de cada uno de ellos, y únicamente de manera casual, o por razones extralingüísticas esta diferencia corresponde más o menos con la división geográfica (Fig. 1.4; Villa, 1995).

En la actualidad existe un grupo aproximadamente de 28 a 31 lenguas mayas cuya distribución geográfica abarca la porción oriental de los estados de Chiapas y Tabasco; casi todo el territorio de Guatemala y Belice; la península de Yucatán y pequeñas porciones del occidente de Honduras y de El Salvador (Fig. 1.4; Garza *et al.*, 1996). Las más conocidas son el yucateco hablado en la mayor parte de la península de Yucatán, el Tzeltal, Tzotzil y el Chol en Chiapas, y el Cakchiquel, el Quiché y el Kekchí, distribuidos en las tierras altas de Guatemala, todas ellas se derivan de una lengua madre común "ProtoMaya" que se habló alrededor del 2000 a.C. (Pérez, 2004; Drew, 2002; Salazar, 2001). Se ha propuesto que el lugar donde se habló el ProtoMaya se puede situar en la zona de los Altos Cuchumatanes al occidente de Guatemala. En términos generales los pueblos más conservadores y aislados se encuentran en las rugosidades de las tierras altas, en tanto que, en los pueblos de las llanuras ya se nota un grado avanzado de aculturación: es decir, el porcentaje de indígenas que desconocen el español alcanza el 50% de la población de las tierras altas y sólo el 9% de la que corresponde a las tierras bajas. Este dato permite entrever la distancia cultural que existe en las dos regiones (Villa, 1995).

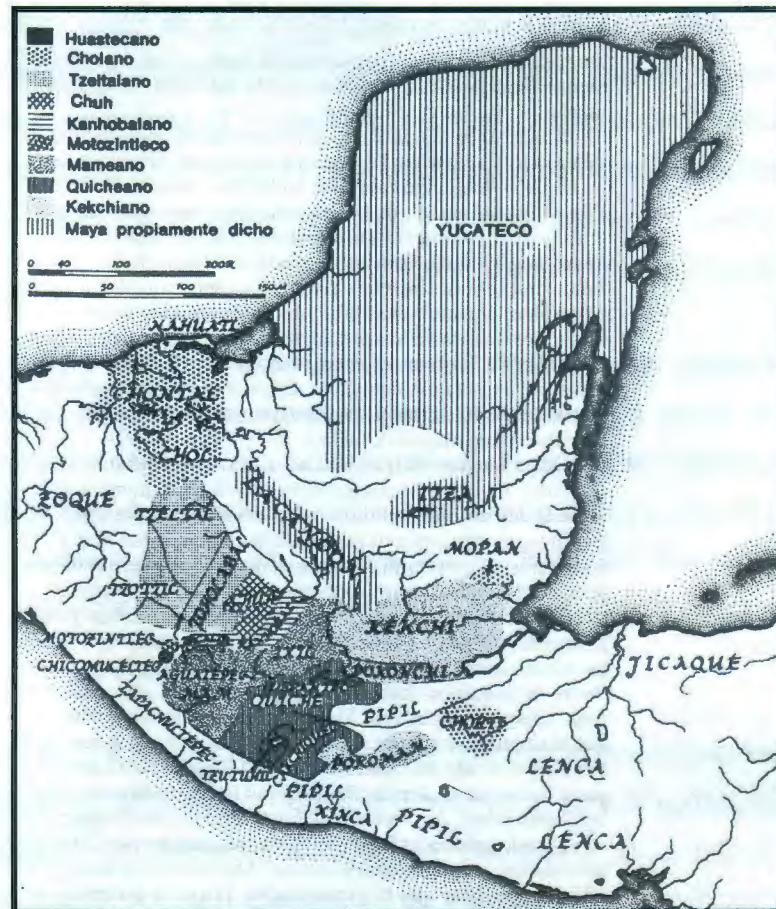


Figura. 1.4. Lingüística del Área Maya. Mapa geográfico del área de las lenguas mayas (Garza *et al.*, 1996)

El principal sistema agrícola productivo para el área mesoamericana ha sido por varios milenios la milpa en la cual la especie principal es el maíz. Sin embargo, este sistema difiere entre cada región cultural ya sea por su historia, los recursos naturales disponibles, tipo de suelos, disponibilidad de agua, la cosmovisión, entre otros (Toledo *et al.*, 2008; Mariaca *et al.*, 2007).

En la actualidad, la milpa en el área maya ha sufrido diversos cambios, los cuales han sido observados tanto en las Tierras Bajas como en las Tierras Altas. De acuerdo a Cuanalo y Arias (1997) en las Tierras Bajas los cambios en el sistema tradicional agrícola

están asociados al incremento en la población rural, la cual se ha duplicado en los últimos 30 años. Entre los cambios más notorios en la intensificación de la milpa se encuentran: el acortamiento en el periodo del barbecho de 20 años el cual ha disminuido gradualmente de 15, 10 hasta 3 años (Ku-Naal, 1995; Lazos, 1995; Hernández-Xolocotzi, 1981); la integración de los productores a un sistema de mercado, el incremento en el uso de productos químicos, la disminución de la diversidad inter e intraespecífica de las especies cultivadas y la pérdida de áreas de vegetación aledañas a las milpas donde se desarrollan las poblaciones silvestres de muchos de los cultivos (Graefe, 2003; Terán y Rasmusén, 1995; Reyes y Aguilar, 1992). Por otro lado, en las Tierras Altas la milpa ha presentado los siguientes cambios: reducción en los periodos de barbecho a tres o incluso un año, crecimiento demográfico acelerado superior a la media nacional, sustitución del estiércol y el abono por el empleo de agroquímicos y herbicidas inorgánicos que ha generado el incremento de arvenses cada vez más agresivas y la caída abrupta de las especies asociadas, la migración a otras partes de México y los Estados Unidos, principalmente por razones económicas y escasez de la tierra (Mariaca *et al.*, 2007; Berlin *et al.*, 2003).

Es importante señalar que en las Tierras Altas se presentan diferencias particulares, siendo principalmente el desplazamiento de los cultivos tradicionales utilizados en la milpa por especies introducidas de mayor demanda en el mercado como por ejemplo: la arveja para el área de Guatemala y el café y la caña de azúcar para el área de Chiapas. En esta última también se ha reportado el abandono del sistema roza-tumba-quema y la paulatina migración de la milpa hacia laderas muy inclinadas. A su vez, la tumba y el uso del hacha desaparecieron cuando así lo hicieron los montes viejos, lo que dio lugar a dos formas de cultivos que persisten actualmente: año y vez, roza y quema, la primera consiste en restaurar la vegetación en pocos meses (de tres a cuatro) y en la segunda el terreno se deja en barbecho uno o tres años después de haberse usado dos años (Mariaca *et al.*, 2007).

ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN *Phaseolus lunatus* var. *lunatus*

Aún cuando *P. lunatus* es una especie con tendencia a la autogamia (Webster *et al.*, 1979), algunos estudios han mostrado que las formas cultivadas de esta especie pueden poseer niveles relativamente altos de diversidad genética.

Maquet *et al.* (1997) mediante 10 aloenzimas estimaron la diversidad genética del frijol Lima de 46 variedades cultivadas obtenidas del banco de germoplasma del CIAT provenientes de América Latina y el Caribe. Los autores obtuvieron una diversidad genética total de $H_T=0.331$. Fofana *et al.* (1997) usando marcadores RAPD, evaluaron la diversidad genética de 46 muestras de *P. lunatus* (16 silvestres y 30 cultivadas pertenecientes a los cv-grs Gran Lima, Sieva y Papa y sus formas intermedias). El empleo de 12 loci confirmó la existencia de dos grandes grupos: el grupo mesoamericano y el grupo andino, así como también mostraron que dentro de cada uno de estos grupos las formas silvestres y cultivadas fueron genéticamente diferentes y la diversidad genética de las formas cultivadas fue alta a comparación de las silvestres. Lioi *et al.* (1998), usando isoenzimas y ADN de cloroplasto, estudiaron 60 muestras cultivadas incluyendo colectas representativas del acervo genético Mesoamericano y Andino y tipos intermedios. Estos autores obtuvieron un número medio de alelos por locus de 1.53, la heterocigosidad esperada fue de 0.13, la diversidad genética total fue de 0.168 y la diversidad genética dentro de los morfogrupos fue de 0.04. Castiñeiras *et al.* (2007), usando marcadores AFLPs, estimaron la diversidad genética de 59 muestras cultivadas del frijol Lima que fueron colectadas en 25 huertos familiares en las tres regiones geográficas principales de Cuba. Estos autores obtuvieron una diversidad genética total de $H_T= 0.119$.

En el caso del área Maya, los primeros estudios sobre la diversidad presente en las formas cultivadas de *P. lunatus* fueron realizados con marcadores morfológicos. Las colectas realizadas por Debouck (1979), Hernández y Delgado (1992), y Nahal (1993), indicaron la existencia de una alta riqueza de formas cultivadas en la agricultura Maya de la península de Yucatán. Posteriormente, Ballesteros (1999) demostró que esta región posee la mayor diversidad de formas cultivadas de *P. lunatus* de todo México. Martínez-Castillo *et al.* (2004) estimaron la diversidad genética del frijol Lima en la península de

Yucatán con base en caracteres morfo-fenológicos, así como información sobre la clasificación Maya. Los resultados generados por estos autores apoyaron lo reportado por Ballesteros (1999), encontrando además la existencia 30 variedades locales y mostrando que la riqueza y la diversidad ($H = 0.8$ a 0.71) de este material fue mayor en las zonas en donde hubo menor intensificación agrícola, poblaciones silvestres y arvenses de *P. lunatus*, y una mayor persistencia de cultura tradicional.

Martínez-Castillo *et al.* (2008) usando 90 loci ISSR, estimaron la diversidad genética de 21 variedades del frijol Lima colectadas en cuatro regiones de la península de Yucatán donde la agricultura tradicional aún persiste. La diversidad genética total del acervo cultivado fue alta (Índice de Shannon=0.33, diversidad genética de Nei=0.28, heterocigosidad promedio=0.31) en comparación a otras regiones de Mesoamérica.

Recientemente, Martínez-Castillo *et al.* (2012) usando marcadores microsatélite realizaron un análisis temporal de la erosión genética a partir de colectas de variedades cultivadas en años diferentes (1979, 2007) en el noreste de Campeche, México. Evaluando los niveles de diversidad genética de ambas colectas, estos autores encontraron que la colecta de 1979 tuvo mayor diversidad genética en comparación con la del 2007 (índice de diversidad genética de Nei = 0.18 y 0.05 respectivamente). El análisis de agrupamiento mostró que los alelos presentes en 1979 no fueron los mismos que aquellos encontrados en el 2007, indicando un desplazamiento alélico en las variedades del acervo genético del frijol lima en los últimos 30 años.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

Estudios basados en análisis morfo-fenológicos y de clasificación tradicional Maya, han reportado a la península de Yucatán como una región con gran riqueza de formas cultivadas de frijol Lima (Martínez-Castillo *et al.*, 2004; Ballesteros, 1999; Nahal, 1993; Hernández y Delgado, 1992). Martínez-Castillo *et al.* (2004), además, indicaron el peligro de pérdida del frijol Lima como consecuencia, principalmente, de cambios asociados a la intensificación de la agricultura tradicional en las Tierras Bajas Mayas. Martínez-Castillo *et al.* (2008), usando marcadores moleculares, confirmaron los niveles altos de diversidad genética para las variedades cultivadas del frijol Lima en esta subárea Maya, así como el riesgo alto de erosión genética de muchas variedades locales que son sembradas por un número reducido de campesinos Mayas. Martínez-Castillo *et al.* (2012), señalaron además que la erosión genética que se ha presentado en el frijol Lima cultivado del noreste de Campeche en el periodo de 1979-2007 podría deberse, principalmente, a dos factores asociados a la intensificación de la agricultura tradicional: 1) la introducción de variedades mejoradas, 2) cambios en los criterios de selección campesina asociados al mercado.

Los trabajos arriba citados indican la importancia de la cultura Maya en la generación y mantenimiento de la diversidad genética de las variedades cultivadas del frijol Lima. Además, estos trabajos señalan los riesgos de erosión genética a los cuales está sujeto este cultivo, así como los factores asociados a dicho riesgo. Sin embargo, estos trabajos han sido realizados solo en las Tierras Bajas Mayas, no existiendo trabajos que consideren al frijol Lima cultivado en las Tierras Altas, y mucho menos estudios que abarquen de forma integral toda el área Maya. En las Tierras Altas, solo se ha colectado semilla de frijol Lima por algunos investigadores (Debouck, Martínez-Castillo), pero hasta ahora no se han realizado estudios sobre la diversidad, estructura y relaciones genéticas de este cultivo para toda el área Maya. Por todo lo antes señalado, es importante realizar trabajos sobre la diversidad genética del acervo cultivado de *P. lunatus* abarcando toda el área Maya. Ante este interés, surgen las siguientes interrogantes:

¿Qué niveles de diversidad genética tiene el acervo cultivado de frijol Lima presente en las Tierras Bajas Mayas en comparación al de las Tierras Altas?

¿Qué factores pueden estar asociados a las diferencias en los niveles de diversidad genética encontrados en cada subárea Maya?

¿Cuál es el grado de estructura genética del acervo cultivado de esta especie en toda el área Maya?

¿Cuáles son las relaciones genéticas existentes entre las accesiones del acervo cultivado presentes en ambas subáreas Mayas?

HIPÓTESIS

El área Maya ha sido dividida por los especialistas en dos subáreas: Tierras Bajas y Tierras Altas (Ruz, 1981). Aunque esta división tiene más una base lingüística y cultural (Villa, 1995), en términos generales corresponde con una división geográfica. Por esto, aún cuando los grupos humanos de ambas subáreas poseen un origen común, existen características agroecológicas particulares en la práctica de la milpa y la problemática de este sistema en éstas subáreas, lo cual podría estar afectando los niveles de diversidad genética de las especies cultivadas en ambas subáreas. Este podría ser el caso del frijol Lima (*P. lunatus*), cultivo de gran importancia entre los campesinos Mayas. En las Tierras Bajas, este cultivo está representado por variedades pertenecientes a los cv-gr- Papa y Sieva, mientras que en las Tierras Altas solo existen variedades del cv-gr. Sieva. Aun cuando no existen trabajos que permitan una comparación entre el cultivo del frijol Lima en ambas subáreas, en el caso de las Tierras Bajas se ha demostrado la existencia de niveles altos de diversidad genética asociados a factores relacionados a la intensificación de la agricultura tradicional así como una estructura genética alta y un patrón de agrupamiento basado en el aislamiento geográfico como resultado de bajos niveles de flujo genético. Considerando lo anterior, se plantean las siguientes hipótesis:

1. La diversidad genética del acervo cultivado del lb (*Phaseolus lunatus* L. var. *lunatus*) es mayor en las Tierras Bajas que en las Tierras Altas.
2. El acervo cultivado del lb (*Phaseolus lunatus* L var. *lunatus*) existente en el área Maya presenta una estructura genética alta.
3. El germoplasma analizado presenta un patrón de agrupamiento basado en la existencia de ambas subáreas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

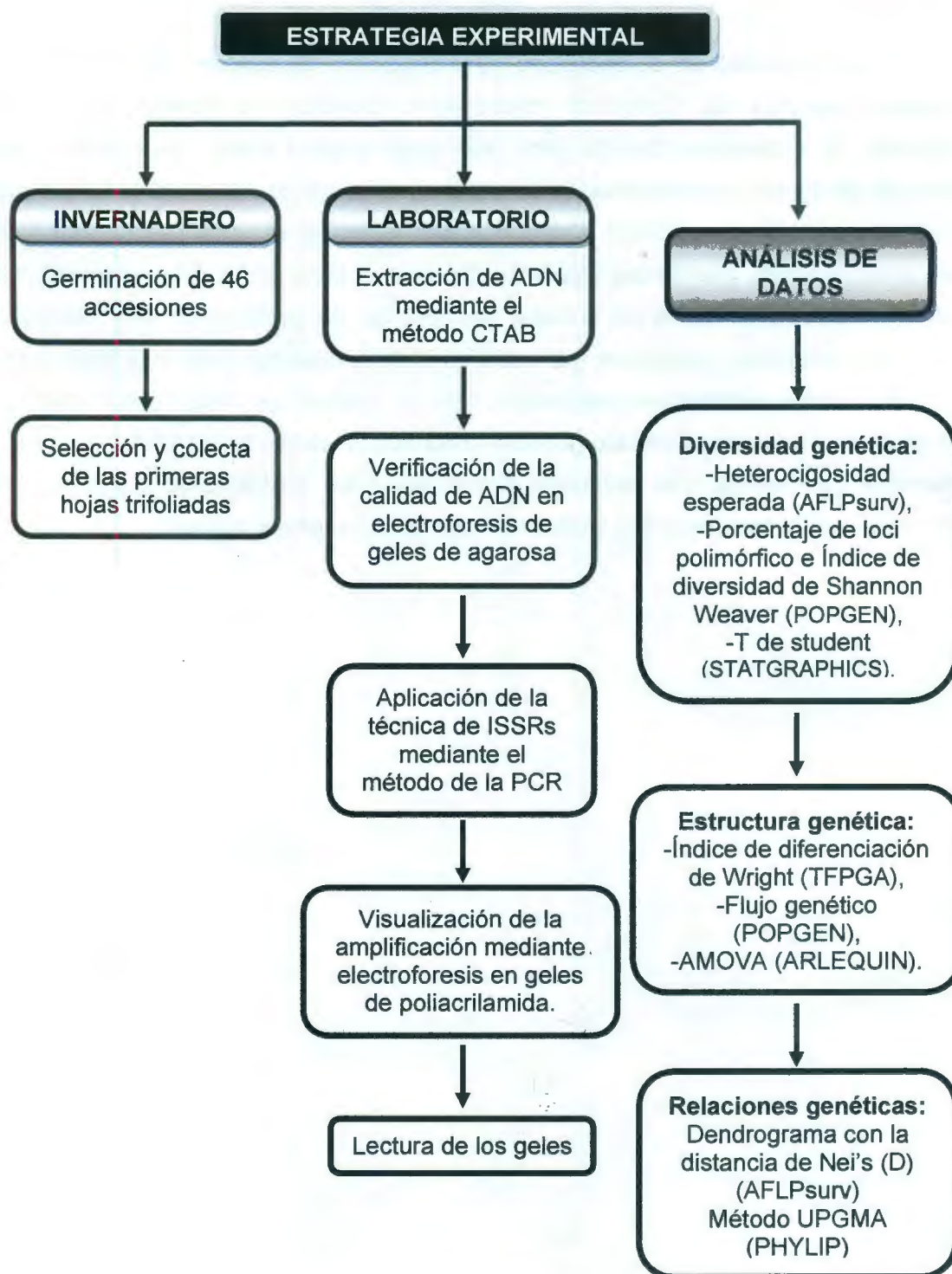
Analizar la diversidad, estructura y relaciones genéticas del acervo cultivado mesoamericano del frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L. var. *lunatus*) del área Maya, mediante marcadores moleculares Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estimar la diversidad genética del acervo cultivado mesoamericano de *P. lunatus* var. *lunatus* presente en el área Maya.
- 2) Estimar y comparar la diversidad genética presente en las Tierras Bajas y Tierras Altas de *Phaseolus lunatus* L var. *lunatus*.
- 3) Determinar la estructura y las relaciones genéticas del acervo cultivado mesoamericano de *P. lunatus* var. *lunatus* del área Maya.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Marcadores Moleculares de la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Se incluyeron 23 accesiones de frijol Lima por cada subárea Maya, las cuales fueron obtenidas del Banco de Germoplasma del Centro de Agricultura Internacional (CIAT) y de la colecta del Dr. Martínez (CICY). Como marcador molecular se usaron secuencias inter-microsatélites (ISSR- InterSimple Sequence Repeats). A partir de los datos obtenidos con cuatro iniciadores, se aplicó un enfoque de genética de poblaciones para evaluar la diversidad, estructura y relaciones genéticas en ambas subáreas y del área Maya como un todo, usando estimadores adecuados para el análisis de datos dominantes. La diferencia en niveles de diversidad genética entre ambas subáreas fue analizada usando estadística paramétrica. Los resultados fueron discutidos considerando las diferencias existentes entre ambas subáreas y del cultivo de frijol Lima en las mismas.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña, R. (1980). Relaciones Geográficas del siglo XVI, Guatemala. Universidad Autónoma de México. México.
- Álvarez C. (2004). Paisajes Mayas. Revista Digital Universitaria. 5.
- Ballesteros, G. (1999). Contribuciones al conocimiento del frijol Lima (*Phaseolus lunatus*) en América Tropical. Tesis de doctorado. Colegio de Posgraduados, México.
- Baudet, J. (1977). The taxonomic status of the cultivated types of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). Tropical Grain Legume Bulletin 7: 29-30.
- Baudoin, J. P., J. Degreef, O. Hardy, F. Janart, I. Zoro. (1998). Development of an in situ conservation strategy for wild Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) populations in the central valley of Costa Rica, in: Reproduction biology, Owens, S. J. y P. J. Rudall. Royal Botanic Garden Press, Kew, UK. 417-426 p.
- Bellon, M., A. Barrientos-Priego, P. Colunga-GarcíaMarín, H. Perales, J. Reyes, R. Rosales, D. Zizumbo-Villarreal. (2009). Diversidad y conservación de recursos genéticos en plantas cultivadas, en Capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. CONABIO, México, 355-382 p.
- Bellon, M. R., J. E. Taylor. (1993). Farmer soil taxonomy and technology adoption. Economic Development and Cultural Change 41: 764-786.
- Berlin, A., B. Berlin, J. Stepp. (2003). Maya of Highland Mexico. Ember 2: 827-839.
- Brush, S. (1991). A farmer-based approach to conservation crop germplasm. Economic Botany 45: 153-165.
- Caetano-Anollés, G., P. Gresshoff. (1997). DNA markers: protocols, applications and overviews. Wiley-Liss Ed. Inc USA. 353 p.
- Canto, L. (1993). Apuntaciones sobre Mesoamérica. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida.
- Carnevali G., I. M. Ramírez, I. A. González (2003). Flora y Vegetación de la Península de Yucatán, en: Naturaleza y sociedad en el área maya. Pasado, presente y futuro, Colunga-GarcíaMarín P., S. A. Larqué. (eds.). Academia Mexicana de Ciencias – Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. México.
- Castiñeiras, L., F. Guzmán, M. Duque, T. Shagardsky, R. Cristobal, M. Carmen. (2007). AFLPs and morphological diversity of *Phaseolus lunatus* L. in Cuban home gardens:

- approaches to recovering the lost ex situ collection. *Biodiversity Conservation*. 16: 2847-2865.
- Coe. M. (1990). *Los Mayas, Incógnitas y Realidades*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- CONABIO. (2007). *Estrategia para la Conservación y Uso Sustentable de la Diversidad Biológica de Michoacán*. Secretaría de Urbanismo y Medio Ambiente (SUMA) y Secretaría de Desarrollo Agropecuario (SEDAGRO). México.
- CONABIO-CONANP-SEMARNAT. (2008). *Estrategia Mexicana para la Conservación Vegetal: Objetivos y Metas*. México.
- Cuanalo de la Cerda, H. E., L. M. Arias. (1997). Cultural and economics factors that affect farmers decision-making in Yucatán, México, in: *Strengthening the scientific basis of in situ conservation of agricultural biodiversity on farm*. Jarvis, D. I. and T. Hodgkin (eds). Options for data collecting and analysis. IPGRE, Rome. 14 p.
- Cubillos, A. (1998). Principios para la conservación *in situ* de parientes silvestres de plantas cultivadas: es el caso de las especies de *Lycopersicon* en Chile. *Serie la Platina*. 68:15.
- Daltabuit, M., L. M. Vázquez, H. Cisneros, A. G. Ruiz. (2006). El turismo costero en la ecorregión del sistema arrecifal mesoamericano. UNAM-CRIM. México.
- Demissie, A. (2000). Conservación "in situ": la experiencia etíope., en: *Boletín de ILEIA para la agricultura y el desarrollo sostenible de bajos insumos externos*. LEISA 30-31.
- DeQiu F., R. R. Krueger, M. L. Roose. (1998). Phylogenetic relationships among selected citrus germplasm accesions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 123: 612 – 617.
- Deqiu, F., M. Roose. (1997). Identification of closely-related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 408-417.
- Domínguez, R., J. Jacobo, R. Alemán. (2002). El uso del frijol reina o chilipuca (*Phaseolus lunatus*) en la región occidental de Honduras. *Noticias sobre cultivos de agricultura* 13: 1-8.
- Drew D. (2002). *Las crónicas perdidas de los reyes mayas*. Colección América Nuestra. Siglo veintiuno, S.A. de C.V.

- Duverger, C. (2007). El primer mestizaje la clave para entender el pasado mesoamericano. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes. Instituto Nacional de Antropología e Historia.
- Escalante, P. (1993). Atlas Histórico de Mesoamérica. Larousse. México.
- Flores, S. (2001). Florística, Ecología y Etnobotánica de las Leguminosas de la Península de Yucatán: Etnoflora Yucatanense 18. Universidad Autónoma de Yucatán. México.
- Fofana, B., L. Harvengt, J. P. Baudoin, P. Du Jardin. (1997). New primers for the polymerase chain amplification of cpDNA intergenic spacers in *Phaseolus* phylogeny. Belgian Journal of Botany 129: 118–122.
- Fofana, B., J. P. Baudoin, X. Vekemans, D. G. Debouck, P. Du Jardin. (1999). Molecular evidence for an Andean origin and a secondary gene pool for the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) using chloroplast DNA. Theoretical and Applied Genetic 98: 202-212.
- Frankel, O. H., M. E. Soule. (1992). Conservation and evolution. Cambridge University Press, Cambridge, U. K. 327 p.
- García, E. (1973). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen, en: Tipos de vegetación de la península de Yucatán. Etnoflora yucatanense Fascículo 3. (1994). Flores, S., Espejel-C. (eds). Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México. 135 p.
- Gargallo, F., A. Santana. (1993). Nuestra América, Belice: sus fronteras y destino. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Garza, M., G. Bustos, A. Izquierdo. (1996). Los Mayas: su tiempo antiguo. Universidad Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Filológicas, Centro de Estudios Mayas, 325 p.
- Gepts, P. (1990). Genetic diversity of seed storage proteins in plants. in : Plant population genetics, breeding and genetic resources. Brown H. D., M. T. Clegg, A. L. Kahler, B.S. Weir (eds). Sunderland, Massachusetts, U.S.A. 64-82 p.
- Graefe, S. (2003). Crop and soil variability in traditional and modern Mayan maize cultivation of Yucatan, Mexico.
- Gutiérrez-Salgado, A., P. Gepts, D. G. Debouck. (1995). Evidence for two gene pools of the Lima bean, *Phaseolus lunatus* L. in the Americas. Genetic Resources and Crop Evolution 42: 15-28.

- Hernández, F., S. Delgado. (1992). Recursos genéticos de frijoles en el oriente de Yucatán, en: La modernización de la milpa en Yucatán: utopía o realidad. Zizumbo D., Ch. Ramussen, L. Arias, C. Terán. (eds.) CICY-DANIDA. Mérida, Yucatán, México. 147-160 p.
- Hernández, J. (2000). Recursos Fitogenéticos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Programa Nacional de Recursos Fitogenéticos. México.
- Hernández – Xolocotzi, E. (1973). Genetic resources of primitive varieties of Mesoamérica: *Zea* spp., *Phaseolus* spp., *Capsicum* spp. and *Cucurbita* spp. In: Survey of crop genetic resources in their centers of diversity. Food and Agriculture Organization. Roma. 76-155 p.
- Hernández – Xolocotzi, E. (1981). Prácticas agrícolas, en: La milpa entre los mayas de Yucatán. Vázquez, P. L. (ed). 45-73 p.
- Hoyt, E. (1988). Conserving the wild relatives of crops. IBPGR-IUCN-WWF. Italia.
- Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. (2006). Enciclopedia de los Municipios de México.
- Instituto Geográfico Nacional. (1972).
- IPGRI. (2003). Módulo de aprendizaje. Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas. Cornell University.
- Jarvis, D. I., L. Myer, H. Klemick, L. Guarino, M. Smale, A. Brown. (2000). A training guide for in situ conservation on farm. Version 1. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Kaplan, L., L. N. Kaplan. (1988). *Phaseolus* in Archaeology, in: Genetic resources of *Phaseolus* beans. Gepts, P. (ed). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holland. 125– 142 p.
- Kaplan, L., T. F. Lynch. (1999). *Phaseolus* (Fabaceae) in archaeology: AMS radiocarbon dates and their significance for pre-Columbian agriculture. Economic Botany 53: 261–272.
- Ku-Naal, R. (1995). Cambios técnicos en la milpa bajo roza-tumba-quema en Yaxcabá, Yucatán, en: La milpa en Yucatán: Un sistema de producción agrícola tradicional. Hernández, X. E. (ed.) Colegio de Postgraduados, México. 401-418 p.

- Lazos-Chavero, E. (1995). La milpa en el sur de Yucatán: dinámica y crisis, en: La milpa en Yucatán: Un sistema de producción agrícola tradicional. Colegio de Postgraduados. México. 35-86 p.
- Lioi, L., F. Sparvoli, R. Bollini. (1999). Variation and genomic polymorphism of lectin-related proteins in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) seeds. Genetic Resources and Crop Evolution 46: 175-182.
- Lioi, L., C. Lotti, I. Galasso. (1998). Isozyme diversity, RFLP of the rDNA and phylogenetic affinities among cultivated Lima beans, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae). Plant Systematics and Evolution 213: 153-164.
- Lioi, L. (1996). Phaseolin diversity in wild Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in American centres of origin. Genetic Resources and Crop Evolution. 43: 575-580.
- Lioi, L. (1994). Morphotype relationships in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) deduced from variation of the evolutionary marker phaseolin. Genetic Resources and Crop Evolution 41: 81-85.
- Lynch, M., B. G. Milligan. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. Molecular Ecology 3: 91-99.
- Mackie, W. (1943). Origin, dispersal and variability of the Lima bean, *Phaseolus lunatus* L. Hilgardia 15: 1 – 29.
- MAGA. (2002). Atlas de Guatemala. Guatemala Ciudad, Guatemala: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación.
- Maquet, A., I. Zoro, M. Delvaux, B. Wathelet, J. P. Baudoin. (1997). Genetic structure of a Lima bean base collection using allozyme markers. Theoretical and Applied Genetics 95: 980-991.
- Mariaca, R., J. Pérez, S. León, A. López. (2007). La milpa tsotsil de los Altos de Chiapas y sus recursos genéticos. El Colegio de la Frontera Sur. Universidad Intercultural de Chiapas, México.
- Martínez-Castillo, J., L. Camacho-Pérez, J. Coello-Coello, R. Andueza-Noh. (2012). Wholesale replacement of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) landraces over the last 30 years in northeastern Campeche, Mexico. Genetic Resources and Crop Evolution 59: 191-204.
- Martínez-Castillo, J., P. Colunga-GarcíaMarín, D. Zizumbo-Villarreal. (2008). Genetic erosion and *in situ* conservation of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) landraces in its

- Mesoamerican diversity center. Genetic Resources and Crop Evolution. 55:1065-1077
- Martínez-Castillo, J. (2005). Diversidad intraespecífica de *Phaseolus lunatus* L. e intensificación de la agricultura tradicional en la Península de Yucatán, México. CICY. Mérida, Yucatán, México.
- Martínez-Castillo, J., D. Zizumbo-Villarreal, H. Perales-Rivera, P. Colunga-GarcíaMarín. (2004). Intraspecific diversity and morpho-phenological variation in *Phaseolus lunatus* L. from the Yucatan Peninsula, México. Economic Botany 58: 354-380.
- Matos, M. (2000). Mesoamérica en la Historia de México Antiguo. V. I. INAH. México.
- Mazhar, F. (1997). Nayakrishi Andoland: an initiative of the Bangladesh peasants for a better living, in: Using diversity: enhancing and maintaining genetic resources on farm. Sperling, L., M. Loevinsohn. (eds) International Development Research Centre, Ottawa.
- Mittermeier, R., N. Myers, C. Goettsch. (1999). Biodiversidad Amenazada. Las Ecorregiones Terrestres Prioritarias del Mundo. CEMEX, Conservación Internacional. Producción de Agrupación Sierra Madre.
- Nahal, J. L. (1993). Reproducción y caracterización de 3 genotipo de frijoles ibes (*P. lunatus* L.) y botiles (*P. coccineus* L. y *P. polyanthus* Green) de Yucatán y Chiapas, informe de participación en proyecto de investigación para optar por el título de Ingeniero Agrónomo. Instituto Tecnológico Agropecuario No 19, Tizimín, Yucatán, México.
- Nienhuis, J., J. Tivang, P. Skroch, J. B. Santos. (1995). Genetic relationships among cultivars and landraces of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. Journal of the American Society Horticultural Science. 120: 300-306.
- Pérez, S. (2004). Las Lenguas Mayas: Historia y Diversidad. Revista Digital Universitaria. 5.
- Picca, A., M. Helguera, N. Salomón, A. Carrera. (2004). Marcadores moleculares, en: Biotecnología y mejoramiento vegetal. Parte 2, capítulo 4. Echenique, V., C. Rubinstein, L. Mroginski. (eds). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires. 446.
- Pimm, S. I., G. J. Russell, J. L. Gittleman, T. M. Brooks. (1995). The future of biodiversity. Science. 269: 347-350.

- Reyes, G. D., C. Aguilar. (1992). Intensificación de la milpa en Yucatán, en: La modernización de la milpa en Yucatán: utopía o realidad. Zizumbo, D., C. H. Ramussen, L. M. Arias, C. Terán. (eds). CICY-DANIDA. Mérida, México. 347-358 p.
- Ruz, L. A. (1981). El pueblo maya. Salvat Mexicana de Ediciones. México.
- Sala, O.E., F. S. Chapin III, J. J. Armesto, R. Berlow, J. Bloomfield, R. Dirzo, E. Huber-Sanwald, L. F. Huenneke, R. B. Jackson, A. Kinzig, R. Leemans, D. Lodge, H. A. Mooney, M. Oesterheld, N. L. Poff, M. T. Sykes, B. H. Walker, M. Walker, D. H. Wall. (2000). Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*. 287: 1770- 1774.
- Salazar, M. de J. (2001). Culturas e interculturalidad en Guatemala. Universidad Rafael Landívar. Guatemala de la asunción.
- Sharer, R. (1999). La civilización maya. Fondo de Cultura Económica. México.
- Smartt, J. (1985). Evolution of grain legumes. Pulses in the genus *Phaseolus*. *Experimental Agriculture* 21: 193-207.
- Tapia, M. E., A. Rosas. (1998). Agrobiodiversidad en La Encañada. Sistematización de las experiencias en conservación *in situ* de los recursos fitogenéticos, Cajamarca. Disponible en URL: <http://www.condesan.org/memoria/CAJ0598.PDF>.
- Terán, S., C. H. Rasmussen. (1995). Genetic Diversity and agricultural strategy in 16th century and present-day Yucatecan milpa agriculture. *Biodiversity and Conservation* 4: 363-381.
- Toledo, V., N. Barrera-Bassols, E. García-Frapolli, P. Alarcón-Chaires. (2008). Uso múltiple y biodiversidad entre los mayas yucatecos. México. *INTERCIENCIA* 33: 345-352.
- Trevor, B., G. Rowe. (2007). An introduction to molecular ecology. Oxford University. 2a edition.
- Vavilov, N. I. (1926). Centers of origin of cultivated plants. *Bulletin of Applied Botany. Genetics and Plant Breeding* 16: 248.
- Villa, A. (1995). Estudios etnológicos: Los mayas. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Webster, B., S. Lynch, C. Tucker. (1979). A morphological study of the development of reproductive structures of *Phaseolus lunatus* L. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 104: 240-243.
- Wolfe, A.D., Q. Y. Siang, S. Kephart. (1998). Assessing hybridization in natural

- populations of *Pentstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Molecular Ecology* 7:1107-1125.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski, D. Labuda. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176–183.
- Zizumbo-Villarreal, D. (1992). Conclusiones Mesa Redonda. La modernización de la milpa en Yucatán. Utopía o realidad, en: *La modernización de la milpa en Yucatán: utopía o realidad*. Zizumbo, D., C. H. Rasmussen, L. M. Arias, S. Terán. (eds). CICY-DANIDA. Mérida, Yucatán, México. 371-378 p.
- Zoro, Bi., A. Maquet, J-P. Baudoin. (2005). Mating system of wild *Phaseolus lunatus* L. and its relationship to population size. *Nature Publishing Group*.

DIVERSIDAD, ESTRUCTURA Y RELACIONES GENÉTICAS DEL ACERVO CULTIVADO MESOAMERICANO DE *P. lunatus* var. *lunatus* EN EL ÁREA MAYA

INTRODUCCIÓN

Mesoamérica es considerado uno de los principales centros de origen de la agricultura y domesticación de plantas (Zizumbo-Villareal y Colunga-García Marín 2010; Ranere *et al.*, 2009; Piperno *et al.*, 2006). En esta región se han encontrado evidencias sobre la domesticación de muchos cultivos de gran importancia mundial y regional, como por ejemplo: el maíz (*Zea mays* L; Matsuoka *et al.*, 2002), el frijol (*Phaseolus vulgaris* L; Bitocchi *et al.*, 2012), la calabaza (*Cucurbita* spp; Sanjur *et al.*, 2002), la ciruela (*Spondias purpurea* L; Miller y Schaal, 2005) y el frijol lima (*Phaseolus lunatus* L; Motta-Aldana *et al.*, 2010) entre muchos otros. A pesar de la megadiversidad que posee esta área, también se ha observado que algunos cultivos de gran importancia socioeconómica se encuentran en peligro de erosión genética como ha ocurrido en el frijol Lima (Martínez-Castillo, 2012; Camacho-Pérez, 2009). Bajo esta consideración, la gran diversidad de recursos fitogenéticos presentes en Mesoamérica deben ser considerados de manera urgente en programas de conservación *in situ* y *ex situ*.

Cuando se habla de la conservación de las especies cultivadas, no solamente es importante conocer sus niveles de diversidad genética, sino también como se encuentra estructurada u organizada esta diversidad. La estructura genética se refiere a la heterogeneidad en las frecuencias alélicas a través de una población causado por flujo génico limitado (Hamilton, 2009). Esta tiene implicaciones en las frecuencias genotípicas y alélicas en los individuos de una población, dividiendo a una población grande en subpoblaciones o unidades pequeñas que llegan a presentar un cierto grado de independencia genética (Hamilton, 2009). El análisis de ambos aspectos son fundamentales en la optimización de las estrategias de conservación y mejora de los recursos genéticos (González, 2001).

Capítulo II

El frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) es la segunda leguminosa cultivada más importante del género *Phaseolus*. Evidencia basada en marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares indican la existencia dentro del acervo primario de esta especie de dos grandes acervos genéticos: el acervo genético andino y el acervo genético mesoamericano, ambos comprendiendo tanto formas silvestres como domesticadas. El acervo genético andino se distribuye desde Colombia hasta el Sur de Brasil. El acervo genético mesoamericano se extiende desde el Suroeste de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina (Fofana *et al.*, 1997; Maquet *et al.*, 1997; Lioi, 1996; Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995; Nienhuis *et al.*, 1995).

La distribución del acervo genético mesoamericano del frijol Lima incluye al área Maya. Específicamente para la península de Yucatán, la cual forma parte de las Tierras Bajas Mayas, el frijol Lima representa el cuarto cultivo más importante dentro del sistema tradicional agrícola maya conocido como milpa (Martínez-Castillo *et al.*, 2004). Ballesteros (1999) y Martínez-Castillo *et al.* (2004) han demostrado que la parte mexicana de la península de Yucatán posee una gran riqueza de formas cultivadas. Martínez-Castillo *et al.* (2004) indicaron, además, que existe un alto riesgo de pérdida de variedades locales de esta especie. Estudios recientes realizados con marcadores moleculares inter-microsatélites (Martínez-Castillo *et al.*, 2008) y microsatélites (Martínez-Castillo *et al.*, 2012) señalan que el acervo genético cultivado del frijol Lima presente en esta región posee niveles altos de diversidad genética en comparación a los niveles de diversidad encontrados en otras regiones de Mesoamérica (Castiñeiras *et al.*, 2007; Lioi *et al.*, 1998; Fofana *et al.*, 1997; Maquet *et al.*, 1997). Estudios realizados por Martínez-Castillo (2005) y Martínez-Castillo *et al.* (2007) mostraron que esta diversidad existente en la Península de Yucatán presentaba una estructura genética alta así como un patrón de agrupamiento de las accesiones basado en un aislamiento geográfico. Estos resultados contrastan con lo reportado por Castiñeiras y colaboradores (2001), quienes, al analizar accesiones cultivadas del ib en huertos familiares de Cuba reportaron un bajo nivel de estructura genética.

De acuerdo a Terán (1992) la milpa bajo roza-tumba y quema ha sido el único sistema aplicable a los suelos pedregosos de Yucatán, tal pedregosidad ha impedido modificaciones agrícolas a gran escala. Este sistema representa la base de la agricultura

Maya y ha sobrevivido por siglos (Zizumbo-Villarreal, 1992). Sin embargo, durante las últimas décadas la milpa ha sufrido una serie de transformaciones que están poniendo en crisis la existencia de este sistema y con ello la diversidad genética de las especies involucradas (Cuanalo y Arias, 1997).

Considerando los niveles altos de diversidad genética de *P. lunatus* reportados para la península de Yucatán, la cual es generada y mantenida por los campesinos Mayas, así como la carencia de trabajos sobre este tema en las Tierras Altas Mayas, surgen las siguientes preguntas: ¿Cuáles son los niveles de diversidad del acervo cultivado mesoamericano de *P. lunatus* var. *lunatus* en toda el área Maya y en las dos subáreas que la componen?, ¿Qué factores podrían estar explicando estos niveles de diversidad genética?, ¿Existe una estructura genética y un patrón de agrupamiento en el germoplasma cultivado de frijol Lima que esten asociados a la existencia de estas dos subáreas Mayas?. Considerando estas interrogantes el objetivo del presente estudio es analizar la diversidad, estructura y relaciones genéticas del acervo cultivado mesoamericano de *P. lunatus* var. *lunatus* en el área Maya, usando marcadores inter-microsatélites (ISSRs).

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO

El área Maya comprende un territorio de aproximadamente 400,000 km² y está conformada por los estados de Campeche, Quintana Roo, Yucatán, Chiapas, Tabasco, el país de Guatemala, Belice, occidente de Honduras y El Salvador. Debido a las diferencias ecológicas y culturales existentes, se ha dividido en dos subáreas: Tierras Altas y Tierras Bajas (Ruz, 1981). Las Tierras Altas comprenden el estado de Chiapas, el país de Guatemala (exceptuando al departamento del Petén), el occidente de Honduras (Copán, Ocotepeque, Lempira, Intibuca, Santa Bárbara, Cortés) y el occidente de El Salvador (Santa Ana, Ahuachapán, Sonsonate). Esta subárea se caracteriza por relieve montañoso, el tipo de vegetación predominante son bosques, selvas altas, los suelos en su mayoría de origen volcánico, el clima, los rangos de precipitación anual y temperatura

varían de acuerdo a la altitud. Sin embargo, los caracteres predominantes son climas húmedos, cálidos y templados, los rangos de precipitación van de los 1000 a los 4500 mm, y los rangos de temperatura anual oscilan entre los 18 y los 25°C. Por su parte, las Tierras Bajas comprenden los estados de la península de Yucatán, el estado de Tabasco, Belice y el departamento del Petén Guatemalteco. De manera general, el clima predominante es cálido subhúmedo con lluvias en verano, el rango de precipitación promedio anual va de los 500 a los 2500 mm y rangos de temperatura promedio anual que van de los 24 a los 28 °C. El relieve es plano con ligeras ondulaciones de altitudes menores a los 500 msnm. La vegetación predominante es selva baja caducifolia (Ruz, 1981).

MATERIAL VEGETAL

Se seleccionaron en total 46 accesiones para el área Maya de las cuales 23 pertenecen a las Tierras Altas y 23 a las Tierras Bajas (Figura 2.1). De cada accesión se seleccionaron cinco individuos para su posterior germinación (Cuadro 2.1). El material provino del Banco de Germoplasma del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y de la colección realizada por el Dr. Martínez Castillo en resguardo en el banco de germoplasma del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY).

EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción del ADN se realizó empleando el método de Dellaporta y colaboradores (1983) con 0.6 g. de tejido foliar de cada individuo.

La calidad del ADN se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con 3 µl de bromuro de etidio (10 mg/ 1 ml de agua destilada), en una solución amortiguadora TBE 1X.

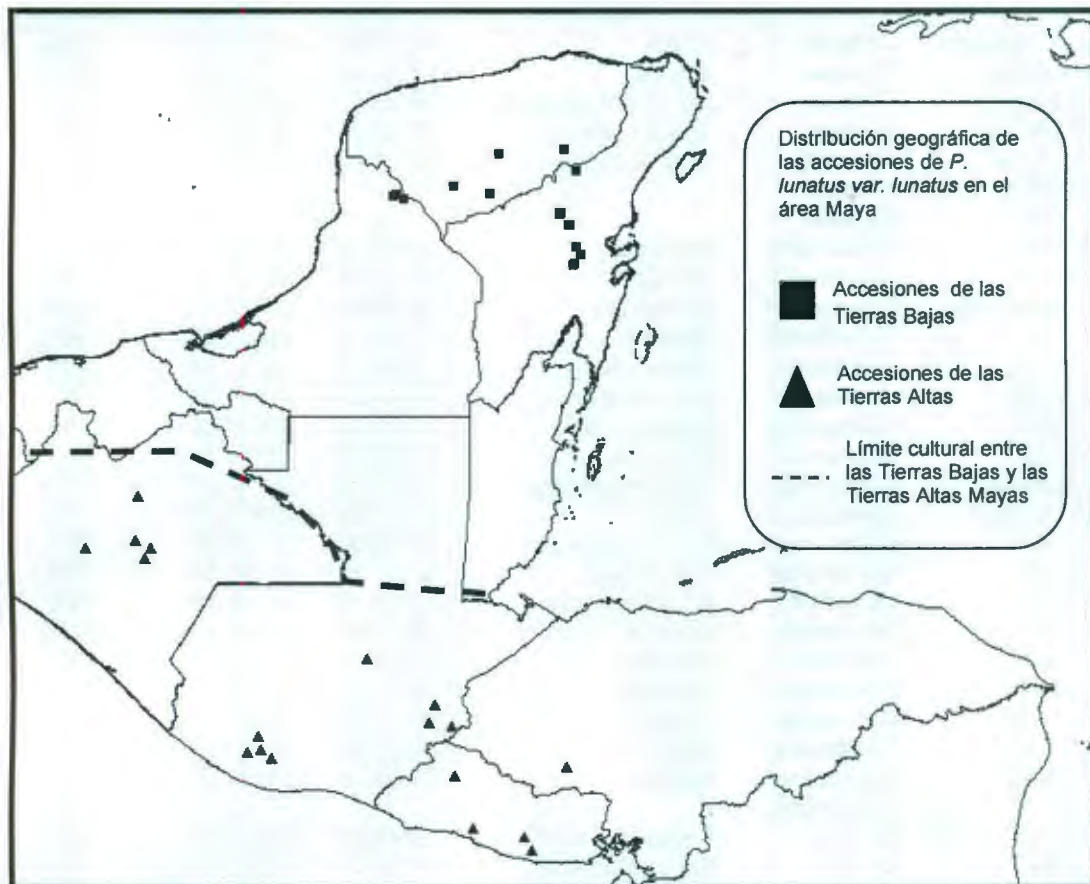


Figura 2.1. Distribución geográfica de las accesiones del acervo cultivado mesoamericano de *P. lunatus* colectadas en el área cultural Maya empleadas en este estudio.

Capítulo II

Cuadro 2.1 Ubicación geográfica de 23 accesiones del acervo cultivado mesoamericano de *P. lunatus* incluidas en el estudio de diversidad, estructura y relaciones genéticas de la subárea de las Tierras Altas (*) y las Tierras Bajas (*).

Accesión	Origen	Municipio o provincia	Latitud (N)	Longitud (O)	Altitud (msnm)
Negro azcatlan*	Chiapas	Bochil	17°00'00"	92°31'48"	1200
Patashete*	Chiapas	Soyalo	16°32'23"	92°32'59"	1200
Trapichito*	Chiapas	Sn. Cristobal las C.	16°26'59"	92°024'0"	2127
G25288*	Chiapas	Tuxtla Gutiérrez	16°26'59"	93°04'11"	535
Patashete*	Chiapas	Villa de acala	16°20'23"	92°28'11"	420
G25564*	Chiapas	-	-	-	-
G25570*	Chiapas	-	-	-	-
G25277*	El Salvador	Cuscatlan	13°25'11"	88°34'47"	800
G25280*	El Salvador	La paz	13°17'23"	88°30'36"	170
Chilipuca roja*	El Salvador	La libertad	13°24'00"	89°10'48"	965
G25595*	El Salvador	Morazán	13°27'36"	88°02'59"	400
Juruma*	El Salvador	Santa ana	14°04'12"	89°17'24"	400
G25285*	Guatemala	Alta verapaz	15°17'23"	90°11'23"	1317
G26305*	Guatemala	Chiquimula	14°19'48"	89°17'24"	700
G25240*	Guatemala	Escuintla	14°15'35"	91°10'12"	1790
Chaparota*	Guatemala	Huehuetenango	15°12'36"	91°10'48"	1538
Ojo de pato*	Guatemala	Jalapa	14°22'48"	89°26'23"	750
G25992*	Guatemala	Quetzaltenango	14°30'00"	91°18'36"	765
G26446*	Guatemala	Retalhuleu	14°19'12"	91°24'35"	150
G26297*	Guatemala	Suchitepequez	14°20'59"	91°16'48"	600
G25256*	Guatemala	Zacapa	14°34'48"	89°19'11"	1230
G26308*	Honduras	Intibuca	14°10'11"	88°09'00"	1000
G26444*	Honduras	Intibuca	14°10'11"	88°09'00"	1000
JMC1030*	Campeche	Calkini	20°07'27"	89°53'02"	74
JMC1033*	Campeche	Calkini	20°04'41"	89°48'37"	111
JMC1052*	Campeche	Nohalal	20°06'31"	89°54'25"	63
Rojó*	Campeche	-	-	-	-
Chak chi*	Q. Roo	Felipe Carrillo P.	19°48'49"	88°06'48"	22
Bacalar*	Q. Roo	Felipe Carrillo P.	19°35'01"	88°02'43"	14
Chak plano*	Q. Roo	Felipe Carrillo P.	19°34'39"	88°02'43"	14
Pool santo*	Q. Roo	Felipe Carrillo P.	19°48'42"	88°06'42"	22
Sac lb*	Q. Roo	Felipe Carrillo P.	19°55'00"	88°13'00"	26
Balche*	Q. Roo	Felipe Carrillo P.	19°55'30"	88°12'36"	26
Balam-pach*	Q. Roo	Felipe Carrillo P.	19°55'53"	88°12'16"	26
Chak-uolis*	Q. Roo	Felipe Carrillo P.	19°23'26"	88°04'29"	14
Box uolis*	Q. Roo	Felipe Carrillo P.	19°29'21"	87°59'40"	15
Box petch*	Q. Roo	Felipe Carrillo P.	19°24'12"	88°03'52"	8
Kan lb*	Q. Roo	Solidaridad	20°21'34"	88°02'10"	23
Mulición*	Q. Roo	Solidaridad	20°21'29"	88°02'17"	23
Xnuk lb*	Yucatán	Peto	20°07'34"	88°55'22"	35
Negro*	Yucatán	Tekax	20°12'13"	89°17'58"	37
Sac*	Yucatán	Valladolid	20°35'56"	88°09'48"	27
Chak*	Yucatán	Valladolid	20°35'42"	88°09'52"	25
X-mejen*	Yucatán	Yaxcaba	20°32'52"	88°49'39"	7
Madza-kitam*	Yucatán	-	-	-	-
Putsica-sutsuy*	Yucatán	-	-	-	-

TÉCNICA DE ISSR

Se escogieron los iniciadores 15, 16, 30 y 32 (Cuadro 2.2) debido a que presentan una buena calidad de amplificación, número (de 50 a 60 bandas polimórficas en total para los cuatro iniciadores) y definición de bandas.

Cuadro 2.2. Características de los cuatro iniciadores ISSR's usados en el análisis de la diversidad, estructura y relaciones genéticas en el área Maya.

Iniciador	Secuencia del iniciador	Temperatura de alineamiento (°C)
15	(GACA) ₃ RG	42
16	YR(GACA) ₃	42
30	(GACAC) ₃ AG	54
32	(GACAC) ₃ RG	54

La amplificación de los ISSR se llevó a cabo utilizando el método de la PCR con volumen final de 20 µl de reacción (Cuadro 2.3 y Figura 2.2). La separación de los productos amplificados se llevó a cabo mediante la electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 5% y teñidos con nitrato de plata.

Cuadro 2.3. Mezcla de reacción para PCR

Componente	Volumen / muestra
H ₂ O	13.18 µl
Buffer de PCR 10X (10mM Tris -HCl (Ph 9), 50 mM KCl; (Invitrogen)	2 µl
dNTPs: dATP, dCTP, dGTP y dTTP (200 µM c/u; Invitrogen)	0.32 µl
Primer 1 µM	2 µl
2 mM MgCl ₂	0.8 µl
Taq – polimerasa (1 U)	0.2 µl
20 ng. ADN template	4 µl
Volumen final =	20 µl

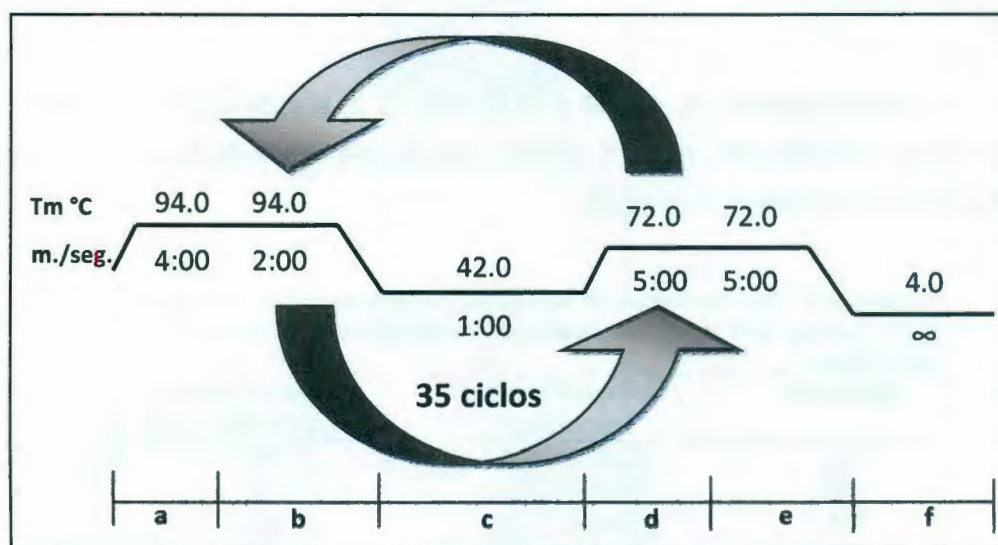


Figura 2.2 Representación del programa de amplificación. a) pre-desnaturalización, b) desnaturalización, c) alineamiento, d) extensión, e) extensión final, f) mantenimiento del producto de amplificación.

ANÁLISIS DE DATOS

Todas las bandas ISSR fueron registradas como 1 (presente) y 0 (ausente) para cada individuo. Para el análisis de diversidad y estructura genética se consideraron los siguientes niveles: área Maya (utilizando las 46 accesiones), Tierras Altas (23 accesiones) y Tierras Bajas (23 accesiones).

Diversidad genética. Considerando que los ISSR son un marcador dominante, se utilizaron los siguientes estimadores: (1) Heterocigosidad esperada (H_e) mediante un enfoque Bayesiano (Zhivotovsky, 1999) con el procedimiento del programa AFLP-SURV V.1 (Vekemans, 2002); (2) porcentaje de loci polimórfico ($P\%$); (3) el índice de diversidad de Shannon-Weaver (I) (Shannon y Weaver 1949) con el procedimiento del programa POPGENE V.1.32 (Yeh *et al.*, 1999). Con el fin de comparar los niveles de diversidad genética obtenidos para las Tierras Bajas y las Tierras Altas, se realizó una prueba t de student usando los valores obtenidos con los estimadores de *Índice de Shannon* y *Heterocigosidad esperada*. Esto se realizó mediante el programa Statgraphics V. 15.2.06 (StatPoint, Inc 1982-2007).

Estructura genética. Para el análisis de la estructura genética considerando que los marcadores ISSR son un marcador dominante los estimadores utilizados fueron los siguientes: la diferenciación genética se analizó mediante el índice de diferenciación de Wright (F_{ST}) mediante el programa TFPGA ver 1.3 (Miller, 1997), asumiendo equilibrio Hardy-Weinberg debido a que se usaron datos diploides/dominantes. También se calculó el flujo génico Nm mediante el programa POPGEN ver 1.32; con el fin de comparar los resultados obtenidos con el estimador F_{ST} , se llevó a cabo un análisis de varianza molecular (AMOVA) mediante el programa ARLEQUIN (Excoffier, 2006).

Relaciones genéticas. Para el análisis de las relaciones genéticas de *P. lunatus* presente en el área Maya se aplicó un análisis de agrupamiento usando el método del algoritmo UPGMA del programa NEIGHBOR y CONSENSE del paquete PHYLIP ver. 3.6 (Felsenstein, 2005) basado en la distancia genética de Nei's (D) (Lynch & Milligan, 1994) obtenida mediante el programa AFLP-SURV 1.0 (Vekemans, 2002). La robustez de la topología fue evaluada con 1000 bootstraps. El dendrograma fue visualizado usando el programa TREEVIEW (Page, 1996).

RESULTADOS

Los cuatro iniciadores de ISSR seleccionados generaron un total de 75 loci, de los cuales el 100% fueron polimórficos. El iniciador 30 presentó el mayor número de loci (21).

DIVERSIDAD GENÉTICA

El área Maya presentó niveles altos de diversidad genética (Cuadro 2.4). A nivel de subáreas, el polimorfismo y el índice de diversidad de Shannon-Weaver fueron mayores en las Tierras Altas comparado con las tierras bajas; contrariamente a lo observado con el estimador de heterocigosidad esperada (Cuadro 2.4). La prueba t de student aplicada al Índice de Shannon-Weaver mostró diferencias significativas entre ambas regiones ($P = 0.03$). Sin embargo, los valores obtenidos con el estimador de H_e no resultaron significativamente diferentes entre ambas regiones.

Cuadro 2.4. Estimadores de diversidad genética del acervo cultivado de *P. lunatus* del área Maya usando 75 loci ISSR.

Región	P (%)	I (ES)	He (ES)
Área maya	100	0.65 (0.00)	0.45 (0.01)
Tierras bajas	97.33	0.51 (0.02)	0.44 (0.01)
Tierras altas	100	0.58 (0.01)	0.36 (0.01)

P%, Porcentaje de loci polimórfico; I, Índice de Shannon-Weaver; He, Heterocigosidad esperada; ES, error estándar

El análisis de los estimadores de la diversidad genética dentro de las regiones indicó que en las Tierras Bajas, la accesión Sac mostró los valores menores de diversidad genética ($P = 4\%$, $I = 0.02$, y $He = 0.04$). Los valores mayores se encontraron en la accesión de Bacalar ($P = 76\%$, $I = 0.51$, y $He = 0.47$) (Cuadro 2.5).

Cuadro 2.5. Estimadores de diversidad genética aplicados a las accesiones del acervo cultivado mesoamericano de *P. lunatus* de las Tierras Bajas mayas, usando 75 loci ISSR.

Accesión	P (%)	I (ES)	He (ES)
Chac chi	30.67	0.20 (0.04)	0.27 (0.02)
Kan lb	33.33	0.22 (0.04)	0.29 (0.02)
Rojo	8	0.05 (0.02)	0.08 (0.02)
Putsica	41.33	0.26 (0.04)	0.33 (0.02)
Bacalar	76	0.51 (0.03)	0.47 (0.01)
Chaac plano	26.67	0.18 (0.03)	0.24 (0.02)
Negro	20	0.13 (0.03)	0.18 (0.02)
Matzakitam	42.67	0.29 (0.04)	0.34 (0.02)
Xmejen	26.67	0.18 (0.04)	0.24 (0.02)
Pool santo	10.67	0.07 (0.02)	0.10 (0.02)
Xnuc lb	13.33	0.08 (0.03)	0.12 (0.02)
Mulición	13.33	0.08 (0.03)	0.13 (0.02)
Sac	4	0.02 (0.01)	0.04 (0.01)
Chak	18.67	0.12 (0.03)	0.18 (0.02)
Sac lb	33.33	0.20 (0.03)	0.36 (0.01)
Balché	21.33	0.14 (0.03)	0.22 (0.02)
Bolampach	13.33	0.07 (0.02)	0.12 (0.02)
Chak uolis	24	0.15 (0.03)	0.28 (0.02)
Box uolis	32	0.18 (0.03)	0.31 (0.02)
Box potch	37.33	0.24 (0.04)	0.39 (0.02)
JMC1030	17.33	0.10 (0.03)	0.15 (0.02)
JMC1033	38.67	0.22 (0.03)	0.27 (0.02)
JMC1052	24	0.13 (0.03)	0.18 (0.02)

P%, Porcentaje de loci polimórfico; I, Índice de Shannon-Weaver; He, Heterocigosidad esperada; ES, error estándar.

En las Tierras Altas, la accesión Chiapas G25607 mostró los valores menores de diversidad genética ($P=8\%$, $I=0.05$, y $He=0.09$). Los valores mayores se obtuvieron en la accesión de Guatemala G26297 ($P=81.33\%$, $I=0.45$, y $He=0.43$) (Cuadro 2.6).

Cuadro 2.6. Estimadores de diversidad genética aplicados a las accesiones del acervo cultivado mesoamericano de *P. lunatus* de las Tierras Altas mayas, usando 75 loci ISSR.

Accesión	P (%)	I (ES)	He (ES)
ChiapasG25288	45.33	0.26 (0.04)	0.26 (0.02)
ChiapasG25302	42.67	0.24 (0.04)	0.24 (0.02)
ChiapasG25564	40	0.24 (0.04)	0.25 (0.03)
ChiapasG25570	45.33	0.24 (0.03)	0.20 (0.02)
ChiapasG25607	8	0.05 (0.02)	0.09 (0.02)
ChiapasG25611	53.33	0.27 (0.03)	0.29 (0.02)
ChiapasG25823	50.67	0.28 (0.03)	0.35 (0.02)
GuatemalaG25240	10.67	0.07 (0.03)	0.14 (0.02)
GuatemalaG26297	81.33	0.45 (0.03)	0.43 (0.01)
GuatemalaG25256	74.67	0.41 (0.03)	0.37 (0.02)
GuatemalaG25285	37.33	0.20 (0.03)	0.24 (0.02)
GuatemalaG25604	69.33	0.40 (0.03)	0.39 (0.02)
GuatemalaG25973	58.67	0.36 (0.04)	0.39 (0.02)
GuatemalaG25992	30.67	0.17 (0.03)	0.23 (0.02)
GuatemalaG26305	56	0.26 (0.03)	0.30 (0.02)
GuatemalaG26446	53.33	0.27 (0.03)	0.26 (0.02)
HondurasG26308	-	-	-
HondurasG26444	26.67	0.14 (0.03)	0.16 (0.02)
El SalvadorG25277	40	0.21 (0.03)	0.22 (0.02)
El SalvadorG25280	32	0.19 (0.03)	0.35 (0.02)
El SalvadorG25364	56	0.33 (0.04)	0.34 (0.02)
El SalvadorG25366	32	0.22 (0.04)	0.29 (0.02)
El SalvadorG25595	28	0.18 (0.03)	0.23 (0.02)

$P\%$, Porcentaje de loci polimórfico; I , Índice de Shannon-Weaver; He , Heterocigosidad esperada; ES, error estándar

ESTRUCTURA GENÉTICA

Los valores obtenidos del análisis de la estructura genética para el área Maya y sus regiones se observan en el Cuadro 2.7. El área Maya presentó una alta estructura genética ($F_{ST}=0.66$). A nivel de subáreas, las Tierras Bajas presentaron una mayor estructura genética ($F_{ST}=0.63$) y menor flujo genético ($Nm=0.25$) que las Tierras Altas ($F_{ST}=0.53$ $Nm=0.34$).

Cuadro 2.7. Estimadores de estructura y flujo genético del acervo cultivado mesoamericano de *P. lunatus* del área maya, usando 75 loci ISSR.

Región	F_{ST}	Nm
Área maya	0.66	0.29
Tierras bajas	0.63	0.25
Tierras altas	0.53	0.34

F_{ST} , Índice de diferenciación genética asumiendo equilibrio Hardy-Weinberg;
 Nm , flujo de genes estimado de G_{ST} o G_{CS} .

Los resultados del AMOVA se observan en el Cuadro 2.8. El porcentaje de variación genética entre poblaciones fue del 65%. La diferenciación genética entre subáreas está apoyada por un porcentaje de variación del 30.63%. La diferenciación entre accesiones dentro de las subáreas es del 34.47% y la diferenciación dentro de las accesiones es de 34.90%. Los valores de los índices de fijación fueron para $F_{SC} = 0.49$, $F_{ST} = 0.65$ y $F_{CT} = 0.31$.

Cuadro 2.8. Análisis molecular de varianza aplicado al acervo cultivado mesoamericano de *P. lunatus* del área Maya usando 75 loci ISSR.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre subáreas	1	649.701	5.91632 Va	30.63
Entre accesiones dentro de las subáreas	44	1611.765	6.65643 Vb	34.47
Dentro de las accesiones	161	1085.133	6.73996 Vc	34.90
Total	206	3346.599	19.31271	

RELACIONES GENÉTICAS

En la Figura 2.3 se observan las relaciones genéticas de 46 accesiones del área Maya. Con algunas excepciones, las accesiones presentaron un patrón de agrupamiento general basado en la existencia de las dos subáreas mayas (bootstrap del 29%), así como en su origen geográfico. Las accesiones de las Tierras Bajas presentaron un soporte de agrupamiento del 73%, mientras que las accesiones de las Tierras Altas presentaron un soporte de agrupamiento del 28%. Entre las excepciones, la accesión G25240 perteneciente a las Tierras Altas se agrupó con las accesiones de Quintana Roo

pertenecientes a las Tierras Bajas (soporte de agrupamiento del 22%). Por su parte, una accesión de Quintana Roo se agrupó con una accesión de Guatemala de las Tierras Altas (soporte de agrupamiento del 27%).

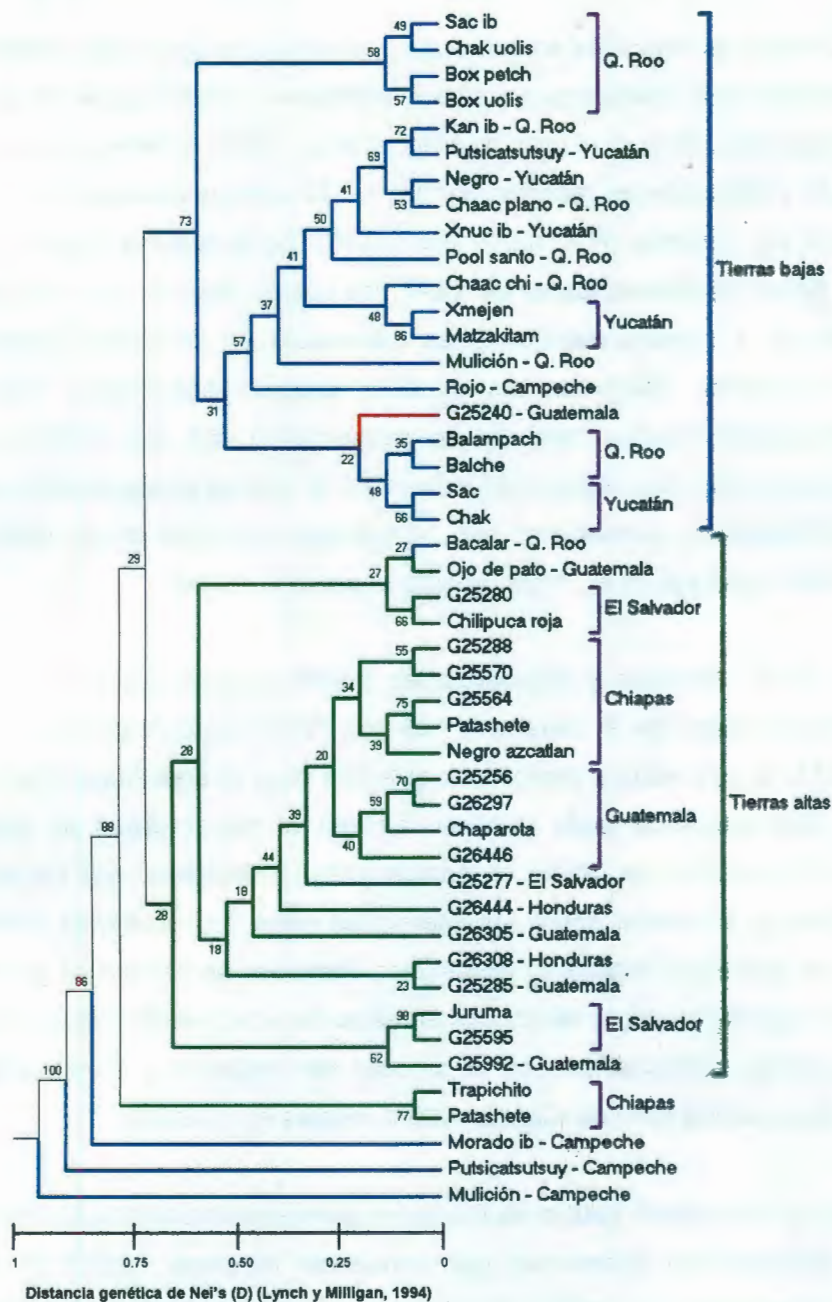


Figura. 2.3. Dendrograma (UPGMA) de las relaciones genéticas de 46 accesiones del área Maya del acervo cultivado Mesoamericano de *P. lunatus*, usando 75 loci de ISSR

DISCUSIÓN

DIVERSIDAD GENÉTICA

Área Maya. Los valores obtenidos en este trabajo para toda el área Maya fueron mayores a los reportados en otros trabajos que, incluso, analizaron accesiones de los dos acervos genéticos de frijol Lima. Este es el caso de Maquet *et al.* (1997) quienes obtuvieron un $P = 50\%$, y Lioi *et al.* (1998) quienes reportan una $He = 0.13$. Ambos valores fueron menores a los encontrados por nosotros ($P = 100\%$, $He = 0.45$). Estos autores usaron accesiones obtenidas del Banco de Germoplasma del CIAT, las cuales abarcaron un área geográfica mayor en relación a nuestro trabajo. Estas diferencias en diversidad pueden ser el resultado del marcador usado en los estudios citados (isoenzimas). Este tipo de marcadores presentan niveles menores de polimorfismo que los ISSRs ya que se encuentran en la porción de la eucromatina del ADN, la cual es la región codificadora, por lo que el ADN tiende a permanecer más conservado (Juvenal *et al.*, 2001; Klug & Cummings, 1999; Cuadrado *et al.*, 1999; Acosta-Viana *et al.*, 1996).

Por su parte, Nienhuis y colaboradores (1995) usando accesiones del acervo cultivado mesoamericano de *P. lunatus* y 125 loci RAPD, encontraron una diversidad genética de 0.11, la cual resulta menor a la obtenida para el área Maya ($He = 0.45$) en este estudio. Esta diferencia pudo deberse también al mayor grado de polimorfismo detectado por los marcadores ISSRs en comparación al detectado por los marcadores RAPDs. Un aspecto a resaltar sobre las diferencias entre los resultados obtenidos por otros autores, es que estos analizaron accesiones obtenidas de bancos de germoplasma. Se ha señalado que las prácticas realizadas en estos bancos pueden inducir niveles altos de erosión genética, comenzando con el proceso de muestreo y continuando con la regeneración de la semilla (Gomez-Campo, 2006; Parzies *et al.*, 2000).

En cambio, en nuestro trabajo se incorporó germoplasma colectado *in situ*, lo cual podría estar considerando accesiones que conservan mayores niveles de diversidad genética en comparación a la contenida en accesiones de los bancos de germoplasma (Martínez-Castillo, comunicación personal). Los niveles altos de diversidad genética

reportados en este trabajo también resaltan la importancia de la cultura Maya como generadora y mantenedora de cultivos con altos niveles de diversidad genética.

Además los resultados sugieren que los ISSR son una herramienta que permite detectar la diversidad presente en esta especie, la cual presenta niveles altos de homocigosis en ciertos sitios del genoma, en comparación con otros marcadores como de tipo bioquímico isoenzimas (Lioi *et al.*, 1998), de sitios específicos de ADN como SSR (Martínez-Castillo *et al.*, 2008), y otros de ADN inespecíficos como los RAPDs (Nienhuis *et al.*, 1995).

Subáreas Mayas. A nivel de subáreas observamos que los estimadores de Porcentaje de loci polimórfico e Índice de diversidad de Shannon-Weaver en las Tierras Altas son estadísticamente significativamente mayores que en las Tierras Bajas. Sin embargo, al comparar ambas regiones con el estimador *He* observamos que no hay diferencias estadísticas significativas (Cuadro 2.4).

Los altos niveles de diversidad observados en las Tierras Altas pueden ser causados por las diferencias de una extensión geográfica mayor en la que se registran un relativo mayor número de grupos étnicos y mayores diferencias ecológicas. De acuerdo al CONANP (Consejo Nacional de Áreas Naturales Protegidas, 2008) el aislamiento geográfico resultante de la gran variación orográfica de esta región ha generado un gran número de microclimas ocupados por grupos étnicos diferentes, en los cuales el proceso evolutivo de las especies ha producido diversidad genética. En este sentido, no es sorprendente la alta diversidad biológica presente en las áreas montañosas de la región. Otro aspecto que podría estar generando alta diversidad en las Tierras Altas es el intercambio de semillas que se da entre los agricultores de las diferentes regiones. Mariaca *et al.* (2007) reportan un intercambio de semilla de *P. lunatus* de la región de la Frailesca a la región de Santa Marta en los Altos de Chiapas; lo cual explicaría el valor relativamente más alto de *Nm* en esa región con respecto a las Tierras Bajas.

La menor diversidad genética observada en las Tierras Bajas puede deberse a los cambios en el sistema tradicional agrícola ocurridos en las últimas décadas. De acuerdo a Cuanalo y Arias (1997) estos cambios están asociados al incremento en la población

rural, la cual se ha duplicado en los últimos 30 años, generando como consecuencias el acortamiento en el periodo del barbecho de 20 años, el cual ha disminuido gradualmente de 15, 10 hasta 3 años (Ku-Naal, 1995; Lazos, 1995; Hernández-Xolocotzi, 1981); la integración de los productores a un sistema de mercado lo que ha provocado el abandono de variedades locales de baja demanda, el incremento en el uso de productos químicos, la disminución de la diversidad inter e intraespecífica de las especies cultivadas y la pérdida de áreas de vegetación aledañas a las milpas donde se desarrollan las poblaciones silvestres de muchos de los cultivos (Graefe, 2003; Terán y Rasmusén, 1995; Reyes y Aguilar, 1992). Al respecto de la reducción de la diversidad genética del ib sucedida en las últimas décadas, Camacho-Pérez (2009) observó que este cultivo ha presentado un alto grado de erosión genética durante el periodo de 1979-2007 en el noreste de Campeche, así como una reducción de flujo genético en el 2007, el cual, pudo suceder debido al aislamiento por distancia o por barreras biológicas (del tipo aislamiento reproductivo) entre las variedades o un aislamiento artificial debido a la acción humana (Schaal, 1975). Así mismo, señala que dos factores asociados a esta erosión pueden ser la introducción de variedades mejoradas y la incorporación de los campesinos mayas a un sistema de mercado.

Los niveles de diversidad genética obtenidos en este trabajo para las Tierras Bajas fueron mayores ($P = 97.33\%$, $I = 0.51$, $He = 0.44$) a los reportados por Martínez-Castillo *et al.* (2008) ($P = 78.9\%$, $I = 0.33$, $He = 0.31$). Considerando que ambos estudios incluyeron accesiones cultivadas bajo el mismo tipo de agricultura Maya, la explicación de estas diferencias puede basarse, principalmente, en la mayor cobertura de la distribución de *P. lunatus* abarcada en nuestro estudio, lo que genera una mejor representación geográfica del germoplasma aquí analizado en comparación con el estudio de Martínez-Castillo *et al.* (2008) en el que analizaron accesiones de un área más restringida.

ESTRUCTURA GENÉTICA

Área Maya. Se observó la existencia de una diferenciación genética muy grande en el área Maya ($F_{st} = 0.66$) (Cuadro 2.7). Esta diferenciación fue confirmada por el AMOVA, el cual mostró que el 65% de variación fue explicada por las diferencias entre subáreas.

Este grado de estructuración podría deberse al bajo nivel de flujo genético observado ($Nm = 0.29$) lo cual, de acuerdo a Maquet *et al.* (1997), está influenciado por el ciclo de vida corto y el sistema de reproducción del frijol Lima (predominantemente autógama). La autogamia en el frijol Lima se ve favorecida por la sincronía de la maduración del polen y el estigma, y su limitada habilidad de dispersión de polen y semillas (Baudoin *et al.*, 1998; Webster *et al.*, 1979). El flujo génico es un componente importante de la estructura poblacional porque determina hasta que punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente, esto es, si existe una gran cantidad de flujo génico entre las poblaciones entonces todas las poblaciones evolucionan juntas, como una sola, pero si hay poco flujo génico cada población evoluciona de forma casi independiente (Slatkin, 1994).

La estructura genética del frijol Lima observada en el área Maya fue mayor a la reportada para Cuba por Castiñeiras *et al.* (2001). Estos autores analizaron 63 accesiones cultivadas en traspacios en tres regiones de Cuba mediante el empleo de AFLPs y reportaron un bajo nivel de estructura genética ($G_{ST} = 0.23$), la mitad del valor encontrado por nosotros. Esta diferencia posiblemente se deba al tipo de marcador molecular utilizado y al tamaño del área muestreada, ya que en nuestro estudio el área muestreada fue mucho mayor a comparación del área analizada por Castiñeiras y colaboradores.

Al comparar el valor de flujo génico (0.29) con el obtenido por Martínez-Castillo *et al.* (2006), quienes reportan un $Nm = 0.17$ para la península de Yucatán, se puede decir que aunque *P. lunatus* es reportada principalmente como una planta autógama, ésta puede alcanzar altas tasas de entrecruzamiento. Chimal-Chan (2008) reportó una tasa de entrecruzamiento de hasta el 73% en poblaciones domesticadas de Quintana Roo. Cabe mencionar que el nivel de entrecruzamiento depende de las condiciones ambientales, la disponibilidad de polinizadores, la variedad sujeta a estudio, el genotipo, las condiciones de crecimiento, el espaciamiento de la planta y la dirección de los vientos prevalecientes (Baudoin *et al.*, 1998).

Subáreas Mayas. A nivel de subáreas, las Tierras Bajas presentaron una diferenciación genética mayor a la encontrada en las Tierras Altas ($F_{ST} = 0.63$ y 0.53 , respectivamente). Un factor que puede estar favoreciendo los niveles mayores de

diferenciación encontrados en las Tierras Bajas es la existencia de formas cultivadas pertenecientes a dos cultigrupos (Papa y Sieva), en comparación a las encontradas en las Tierras Altas en donde solo se encuentran variedades del cv-gr. Sieva. Fofana *et al.* (1997) han señalado que ambos cultigrupos se encuentran en un proceso de especiación simpátrica incipiente que a la larga generará un mayor grado de diferenciación genética entre ambos. El cual es consecuencia de la existencia de una fuerte presión de selección que ejercen los agricultores para limitar el entrecruzamiento de sus diferentes variedades para conservar las características deseadas en éstas. La demanda de ciertas variedades en el mercado influye en la selección de las semillas, por lo que, si éstas se mantienen íntegras en sus características, el campesino asegura su venta en el mercado. Al respecto, Martínez-Castillo *et al.* (2004), reportaron que la incorporación de los pequeños productores al mercado es uno de los factores principales en el proceso de intensificación de la agricultura tradicional en la península de Yucatán. El nivel mayor de flujo génico observado en las Tierras Altas (Cuadro 2.7) posiblemente sea un indicador de su relativa baja importancia mercantil en esta zona, por lo que, los agricultores no ejercerían presión de selección sobre las variedades permitiendo el entrecruzamiento entre las mismas.

En particular para las Tierras Bajas, nuestros resultados fueron mayores a los reportados por Martínez-Castillo *et al.* (2007) ($Gst = 0.47$). Estos autores analizaron la estructura genética del complejo silvestre-arvense-domesticado de 24 accesiones (11 silvestres, 1 arvense y 12 domesticadas) del frijol Lima empleando marcadores microsatélites. Las diferencias encontradas entre ambos trabajos se deben, posiblemente, al tipo de marcador molecular empleado en cada uno de estos. Estudios de las variedades cultivadas del frijol Lima mostraron que el empleo de ISSRs proporciona un mayor número de loci para ser analizados y con esto la posibilidad de obtener mayores niveles de polimorfismo, esto en comparación a marcadores codominantes como los SSR (Martínez-Castillo *et al.*, 2008), otro factor importante es el número de accesiones y loci analizados, el cual fue mayor en nuestro trabajo en relación a los analizados por Martínez-Castillo *et al.* (2007).

RELACIONES GENÉTICAS

El análisis de relaciones genéticas, con algunas excepciones, mostró un patrón de agrupamiento general basado en la existencia de las dos subáreas mayas. Este patrón de agrupamiento es acorde con la alta diferenciación genética encontrada en el área Maya.

Con algunas excepciones, la mayoría de las accesiones de las Tierras Bajas se congregaron con un alto porcentaje de agrupamiento (73%), en comparación al grupo que comprendió las accesiones de las Tierras Altas (28%). Estos valores de agrupamiento están relacionados con el grado de estructuración y a los niveles de flujo genético observado en cada subárea. Al interior de cada grupo se observó un agrupamiento de acuerdo a su origen geográfico. Entre las excepciones a este patrón de agrupamiento, se encontró que en el grupo formado por las accesiones de las Tierras Bajas una accesión de Guatemala perteneciente a las Tierras Altas se agrupó con accesiones de Quintana Roo, sin embargo, el porcentaje de agrupamiento fue bajo (22%). Así mismo una accesión de Quintana Roo se agrupó con una accesión de Guatemala de las Tierras Altas, presentando también un bajo porcentaje de agrupamiento (27%). Aun cuando no se encontraron trabajos que estudiaran el flujo de semillas entre comunidades Mayas de las Tierras Bajas y Altas, este podría haber sido una situación común en décadas recientes, como resultado del desplazamiento de campesinos mayas de Guatemala hacia México generado por los conflictos bélicos en Guatemala.

El patrón de agrupamiento observado en este trabajo es similar al encontrado por Martínez-Castillo (2005). Este autor, usando marcadores SSR, estudió la estructura y relaciones genéticas de 12 poblaciones cultivadas de frijol Lima ubicadas en cuatro regiones Mayas de la península de Yucatán. Encontró que estas poblaciones se agrupaban de acuerdo a la región en donde fue colectada y concluyó que este patrón era consecuencia de bajos niveles de flujo genético y de un aislamiento por distancia entre las poblaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta-Viana, K. Y., J. E. Zavala-Castro. (1996). Proteínas de unión a DNA. Revista Biomédica 7: 163 – 172.
- Ballesteros, G. (1999). Contribuciones al conocimiento del frijol lima (*Phaseolus lunatus*) en América Tropical. Tesis de doctorado. Colegio de Posgraduados, Estado de México.
- Baudoin, J. P., J. Degreef, O. Hardy, F. Janart, I. Zoro. (1998). Development of an in situ conservation strategy for wild Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) populations in the central valley of Costa Rica, in: Reproduction biology, Owens, S. J. y P. J. Rudall. Royal Botanic Garden Press, Kew, UK. 417-426 p.
- Bitocchi, E., L. Nanni, E. Bellucci, M. Rossi, A. Giardini, P. Zeuli, G. Logozzo, J. Stougaard, P. McClean, G. Attene, R. Papa. (2012). Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. Proceeding of Natural Academic Science USA. doi/10.1073/pnas.1108973109.
- Camacho-Pérez, L. (2009). Análisis de la erosión genética en variedades del ib (*Phaseolus lunatus* L.) del Noreste de Campeche, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México 93 p.
- Castiñeiras, L., F. Guzmán, M. Duque, T. Shagardsky, R. Cristobal, M. Carmen. (2007). AFLPs and morphological diversity of *Phaseolus lunatus* L. in Cuban home gardens: approaches to recovering the lost ex situ collection. Biodiversity Conservation. 16, 2847-2865.
- Castiñeiras, L., T. Shagardsky, V. Fuentes, Z. Fundora, L. Fernández, V. Moreno, O. Barrios, P. Sánchez, L. Walón, M. F. Pérez, G. Puldón. (2001). El frijol caballero (*Phaseolus lunatus* L.) un cultivo marginal y en peligro de erosión genética en Cuba. Revista del Jardín Botánico Nacional 22: 133-138.
- Chimal-Chan, A. (2008). Polinización y flujo genético en *Phaseolus lunatus* L. silvestres y cultivados en la Península de Yucatán. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, México.
- CONAP. (2008). Guatemala y su biodiversidad: Un enfoque histórico, cultural, biológico y económico. Consejo Nacional de Áreas Protegidas, Oficina Técnica de Biodiversidad. Guatemala. 650 p.

- Cuadrado, A., T. Schwarzacher, J. S. Heslop-Harrison, N. Jouve. (1999). Organización de secuencias repetidas y microsatélites en plantas. II Congreso de la Sociedad Española de Genética.
- Cuanalo de la Cerda, H. E., L. M. Arias. (1997). Cultural and economics factors that affect farmers decision-making in Yucatán, México, in: Strengthening the scientific basis of in situ conservation of agricultural biodiversity on farm. Jarvis, D. I. and T. Hodgkin (eds). Options for data collecting and analysis. IPGRE, Rome. 14 p.
- Dellaporta, S., J. Wood, J. Hicks. (1983). A plants DNA minipreparation: Versión 11. Plant Molecular Biology Reporter. 1: 19-21.
- Excoffier, L., G. Laval, S. Schneider. (2006). Arlequin ver. 3.11: An integrated software package for population genetics data analysis, Computational and Molecular Population Genetics Lab, University of Berne, Switzerland.
- Felsenstein, J. (2005). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Fofana, B., J. P. Baudoin, X. Vekemans, D. G. Debouck, P. Du Jardin. (1999). Molecular evidence for an Andean origin and a secondary gene pool for the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) using chloroplast DNA. Theoretical and Applied Genetic 98: 202-212.
- Fofana, B., L. Harvengt, J. P. Baudoin, P. Du Jardin. (1997). New primers for the polymerase chain amplification of cpDNA intergenic spacers in *Phaseolus* phylogeny. Belgian Journal of Botany 129: 118-122.
- Gómez-Campo, C. (2006). Erosion of genetic resources within seed banks: the role of seed containers. Seed Science Research 16:291-294.
- González, M. S. (2001). Estructura genética poblacional y flujo genético de *Pinus pinaster* Aiton en el noreste de la península Ibérica.
- Gutiérrez-Salgado, A., P. Gepts, D. G. Debouck. (1995). Evidence for two gene pools of the Lima bean, *Phaseolus lunatus* L. in the Americas. Genetic Resources and Crop Evolution 42: 15-28.
- Hamilton, M. B. (2009). Population genetics. Wiley-blackwell. 470.
- Juvenal G., D. A. Gangitano, R. A. Padula. (2001). ADN y análisis forense. CNEA. Número 4, 21-25.
- Klug, W., M. Cummings. (1999). Conceptos de genética. Practice Hall. 517 – 545 p.

- Lioi, L., F. Sparvoli, R. Bollini. (1999). Variation and genomic polymorphism of lectin-related proteins in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) seeds. Genetic Resources and Crop Evolution 46: 175-182.
- Lioi, L., C. Lotti, I. Galasso. (1998). Isozyme diversity, RFLP of the rDNA and phylogenetic affinities among cultivated Lima beans, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae). Plant Systematics and Evolution 213: 153-164.
- Lioi, L. (1996). Phaseolin diversity in wild Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in American centres of origin. Genetic Resources and Crop Evolution. 43: 575-580.
- Lynch, M., B. G. Milligan. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. Molecular Ecology 3: 91-99.
- Maquet, A., I. Zoro, M. Delvaux, B. Wathelet, J. P. Baudoin. (1997). Genetic structure of a Lima bean base collection using allozyme markers. Theoretical and Applied Genetics 95: 980-991.
- Mariaca, R., J. Pérez, S. León, A. López. (2007). La milpa tsotsil de los Altos de Chiapas y sus recursos genéticos. El Colegio de la Frontera Sur. Universidad Intercultural de Chiapas, México.
- Martínez-Castillo, J., L. Camacho-Pérez, J. Coello-Coello, R. Ándueza-Noh. (2012). Wholesale replacement of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) landraces over the last 30 years in northeastern Campeche, Mexico. Genetic Resources and Crop Evolution 59: 191-204.
- Martínez-Castillo, J., P. Colunga-GarcíaMarín, D. Zizumbo-Villarreal. (2008). Genetic erosion and *in situ* conservation of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) landraces in its Mesoamerican diversity center. Genetic Resources and Crop Evolution. 55:1065-1077.
- Martínez-Castillo, J., Zizumbo-Villarreal, D., Delgado-Valerio., Colunga-GarcíaMarín, P. (2006). Structure and genetic diversity of wild populations of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Yucatán Peninsula, México. Crop. Sci. 46: 1071 -1080 p.
- Martínez-Castillo, J. (2005). Diversidad intraespecífica de *Phaseolus lunatus* L. e intensificación de la agricultura tradicional en la Península de Yucatán, México. CICY. Mérida, Yucatán, México.
- Martínez-Castillo, J., D. Zizumbo-Villarreal, H. Perales-Rivera, P. Colunga-GarcíaMarín. (2004). Intraspecific diversity and morpho-phenological variation in *Phaseolus lunatus* L. from the Yucatan Peninsula, México. Economic Botany 58: 354-380.

- Matsuoka, Y., Y. Vigouroux, M. Goodman, G. Sanchez, E. Buckler, J. Doebley. (2002) A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceeding of Natural Academic Science USA* 99: 6080-6084.
- Miller, A., B. Schaal. (2005). Domestication of a Mesoamerican cultivated fruit tree, *Spondias purpurea*. *Proceeding of Natural Academic Science USA* 36: 12801-12806.
- Miller, A., P. Mark. (1997). Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
- Motta-Aldana, J., M. Serrano, H. Torres, C. Villamizar, G. Debouck, M. Chacón. (2010). Multiple origins of lima bean landraces in the Americas: evidence from chloroplast and nuclear DNA polymorphisms. *Crop Science* 50:1773-1787.
- Nienhuis, J., J. Tivang, P. Skroch, J. B. Santos. (1995). Genetic relationships among cultivars and landraces of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 120: 300–306.
- Page, R. (1996). TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Parzies, H., W. Spoor, R. Ennos. (2000). Genetic diversity of barley landraces accessions (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) conserved for different lengths of time in ex situ gene banks. *Heredity* 84: 476–486.
- Piperno, D. (2006). Quaternary environmental history and agricultural impact on vegetation in Central America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 93:274-296.
- Ranere, A., D. Piperno, I. Holst, R. Dickau, J. Iriarte. (2009). The cultural and chronological context of early Holocene maize and squash domestication in the central Balsas River Valley, Mexico. *Proceeding of Natural Academic Science USA* 106: 5014–5018.
- Ruz, L. A. (1981). *El pueblo maya*. México: Salvat.
- Sanjur, O., D. Piperno, T. Andrés, W. Wessel. (2002) Phylogenetic relationships among domesticated and wild species of *Cucurbita* (*Cucurbitaceae*) inferred from a mitochondrial gene: Implications for crop plant evolution and areas of origin. *Cedinging of Natural Academic Science USA* 99: 535-540.
- Schaal, B. (1975). Population structure and local differentiation in *Liatris cylindraceae*. *The American Naturalist*. 109: 511-528.

Capítulo II

- Shannon, C. E., W. Weaver. (1949). The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.
- Slatkin, M. (1994). Gene flow and population structure, in: Ecological Genetics, Real, L (ed.). Princeton University. New Jersey, 238 p.
- StatPoint, Inc. (2006). Statgraphics Centurión XV. Version 15.2.05 1982-2007.
- Vekemans, X. (2002). AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.
- Webster, B., S. Lynch, C. Tucker. (1979). A morphological study of the development of reproductive structures of *Phaseolus lunatus* L. Journal of the American Society for Horticultural Science 104: 240-243.
- Yeh, F. C., T. J. Boyle. (1999). POPGENE v. 1.31. Microsoft Windows-based freeware for population analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Edmonton.
- Zhivotovsky, L. (1999). Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. Molecular Ecology 8:907-913.
- Zizumbo-Villarreal, D., P. Colunga Garcia-Marín. (2010) Origin of agriculture and plant domestication in West Mesoamerica. Genetic Resources and Crop Evolution 57: 813-825.
- Zizumbo-Villarreal, D. (1992). Conclusiones Mesa Redonda. La modernización de la milpa en Yucatán. Utopía o realidad, en: La modernización de la milpa en Yucatán: utopía o realidad. Zizumbo, D., C. H. Rasmussen, L. M. Arias, S. Terán. (eds). CICY-DANIDA. Mérida, Yucatán, México. 371-378 p.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

Los valores de diversidad y estructura genética observados en este estudio fueron mayores a los reportados en otros trabajos, esto se debió, posiblemente, a factores como la procedencia del material analizado, el grado de persistencia cultural, la extensión del área analizada, el número de accesiones y una diferencia en el marcador molecular empleado (ISSR vs. isoenzimas, RAPD o SSR).

A nivel de subáreas, los valores obtenidos (% loci polimórficos, índice Shannon-Weaver) mostraron que las Tierras Altas poseen mayores niveles de diversidad genética que las Tierras Bajas. Sin embargo, el estimador de Heterocigosidad esperada no mostró diferencias significativas entre ambas subáreas, esto se debió, posiblemente, al modelo bayesiano bajo el cual fue obtenido este estimador. Sin embargo, la existencia de un mayor número de grupos étnicos, grandes diferencias ecológicas, así como el intercambio de semillas entre los agricultores de las Tierras Altas podrían estar influyendo en los altos niveles de diversidad genética y de flujo genético encontrados en las Tierras Altas Mayas (Consejo Nacional de Áreas Naturales Protegidas, 2008; Mariaca *et al.*, 2007). A pesar de que en las Tierras Bajas se han reportado altos niveles de diversidad genética en el frijol Lima, factores asociados a la intensificación de la agricultura, el acelerado incremento de la población rural, así como fenómenos naturales como huracanes y sequías, parecen haber repercutido negativamente en el grado de diversidad genética observado en esta subárea (Martínez-Castillo *et al.*, 2004; Ku-Naal, 1995; Lazos, 1995; Hernández-Xolocotzi, 1981; Schaal, 1975).

El análisis de relaciones genéticas presentó un agrupamiento general basado en la existencia de las dos subáreas mayas. Este agrupamiento está sustentado por el alto grado de estructura genética y los niveles de flujo genético observados en cada subárea. Al interior de cada grupo se observó un agrupamiento de acuerdo a su origen geográfico. El patrón de agrupamiento observado en este trabajo es similar al encontrado por Martínez-Castillo (2005). Este autor, usando marcadores SSR, estudió la estructura y relaciones genéticas de 12 poblaciones cultivadas de frijol Lima ubicadas en cuatro regiones Mayas de la península de Yucatán. Encontró que estas poblaciones se

agrupaban de acuerdo a la región en donde fueron colectadas y concluyó que este patrón era consecuencia de bajos niveles de flujo genético y de un aislamiento por distancia entre las poblaciones.

Los resultados encontrados en este trabajo permiten concluir que:

1. La diversidad genética del frijol Lima presente en el área Maya fue alta con los loci aquí considerados, en comparación a lo reportado en otros estudios.
2. A nivel de subáreas, el nivel de diversidad genética encontrado en las Tierras Altas (con base en el porcentaje de loci polimórfico y el Índice de Shannon) fue mayor al obtenido en las Tierras Bajas, rechazando de esta manera la primera hipótesis de investigación.
3. Una alta estructura genética F_{ST} en el área Maya fue observada, la cual, está asociada a la existencia de las dos subáreas geográficas. Las Tierras Bajas presentaron mayor diferenciación y menores niveles de flujo génico en comparación a las Tierras Altas. Los niveles de diferenciación genética son altos incluso a nivel de subáreas, cumpliéndose la hipótesis propuesta.
4. Las poblaciones de cada subárea están más relacionadas genéticamente entre sí. El patrón de agrupamiento es un reflejo de la diferenciación genética existente entre éstas, cumpliéndose nuestra hipótesis.

PERSPECTIVAS

Aunque los resultados generados en este trabajo son de gran importancia para la conservación de *P. lunatus* en el área Maya, se necesita realizar estudios sobre la problemática del ib en la agricultura tradicional Maya de las Tierras Altas para llevar a cabo una mejor implementación de programas de conservación *ex situ* e *in situ* en toda el área Maya y así evitar la pérdida de variedades tradicionales de esta especie, lo que permitiría a futuro incrementar la diversidad genética y biológica en los cultivos modernos. Para esto es recomendable realizar trabajos a futuro que contemplen los siguientes aspectos:

1. Se recomienda realizar colectas *in situ* del frijol Lima cultivado en las Tierras Altas.
2. Realizar un estudio etnobotánico de la especie en las Tierras Altas mayas para conocer su dinámica productiva.
3. Así también, es importante realizar un estudio mercantil de la especie puesto que no existe nada en relación a este tema.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CONAP. (2008). Guatemala y su biodiversidad: Un enfoque histórico, cultural, biológico y económico. Consejo Nacional de Áreas Protegidas, Oficina Técnica de Biodiversidad. Guatemala. 650 p.
- Hernández – Xolocotzi, E. (1981). Prácticas agrícolas, en: La milpa entre los mayas de Yucatán. Vázquez, P. L. (ed). 45-73 p.
- Ku-Naal, R. (1995). Cambios técnicos en la milpa bajo roza-tumba-quema en Yaxcabá, Yucatán, en: La milpa en Yucatán: Un sistema de producción agrícola tradicional. Hernández, X. E. (ed.) Colegio de Postgraduados, México. 401-418 p.
- Lazos-Chavero, E. (1995). La milpa en el sur de Yucatán: dinámica y crisis, en: La milpa en Yucatán: Un sistema de producción agrícola tradicional. Colegio de Postgraduados. México. 35-86 p.
- Mariaca, R., J. Pérez, S. León, A. López. (2007). La milpa tsotsil de los Altos de Chiapas y sus recursos genéticos. El Colegio de la Frontera Sur. Universidad Intercultural de Chiapas, México.
- Martínez-Castillo, J. (2005). Diversidad intraespecífica de *Phaseolus lunatus* L. e intensificación de la agricultura tradicional en la Península de Yucatán, México. CICY. Mérida, Yucatán, México.
- Martínez-Castillo, J., D. Zizumbo-Villarreal, H. Perales-Rivera, P. Colunga-GarcíaMarín. (2004). Intraspecific diversity and morpho-phenological variation in *Phaseolus lunatus* L. from the Yucatan Peninsula, México. Economic Botany 58: 354-380.
- Schaal, B. (1975). Population structure and local differentiation in *Liatris cylindraceae*. The American Naturalist. 109: 511-528.