



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**DOMESTICACIÓN DEL ACERVO GENÉTICO
MESOAMERICANO DEL FRIJOL LIMA (*Phaseolus
lunatus* L.)**

Tesis que presenta

RUBÉN HUMBERTO ANDUEZA NOH

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Recursos Naturales)

Mérida, Yucatán, México

Febrero 2013





RECONOCIMIENTO



Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "DOMESTICACIÓN DEL ACERVO GENÉTICO MESOAMERICANO DEL FRIJOL LIMA (*Phaseolus lunatus* L.)" 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 e Ivonne Sánchez del Pino, dentro de la Opción Doctorado después de Maestría, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota

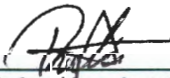
Coordinador de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México; a 18 de Febrero de 2013

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: Rubén Humberto Andueza Noh

DEDICATORIA

El resultado de cuatro años de estudio y esfuerzo se ve reflejado en la presente tesis la cual va dedicada a Dios por ser tan generoso conmigo al prestarme la vida y darme sabiduría para salir siempre adelante.

A mis padres Edilbertha Noh Poot y Marco Antonio Andueza May quienes desde pequeño me condujeron por el camino correcto brindándome educación, amor y confianza.

A mis 6 hermanos con quienes crecí y que siempre estuvieron a mi lado con un sabio consejo cuando lo necesitaba.

A la familia Camacho-Peréz por todo el apoyo incondicional que me han brindado.

A un ser muy especial que siempre ha estado a mi lado desde aquel momento en que decidí embarcarme en esta gran aventura, aventura que sin tí no hubiera sido la misma. Sí ese ser especial eres tú y te dedico este trabajo con todo mi amor mi "LUCIANA".

Con dedicatoria especial a un pequeñito que vino a traernos mucha felicidad en nuestro pequeño hogar, con mucho amor y cariño para ti Saúl Humberto.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado a través de la Beca 228110 durante mi formación académica.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán por las facilidades brindadas para el desarrollo de esta tesis, en especial a la Unidad de Recursos Naturales.

Al proyecto número 82642 de Ciencia Básica CONACYT y la Society National Geographic (proyecto 8622-09) por el apoyo económico otorgado para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Jaime Martínez Castillo por haber confiado en mí y darme la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis bajo su dirección, así como por considerarme más que un estudiante un amigo.

A la Dra. Ivonne Sánchez del Pino por haber aceptado ser mi co-directora durante el desarrollo de mi tesis, su apoyo, asesoría y amistad otorgada.

A la Dra. María Isabel Chacón y a la Universidad Nacional de Colombia por haberme brindado la oportunidad de desarrollar parte de mi tesis en los laboratorios de la Facultad de Agronomía, su apoyo y asesoría.

Al técnico Julian Coello-Coello quien como un gran amigo me brindo su apoyo y asesoría incondicional en el trabajo de laboratorio y al técnico Filogonio May Pat por su ayuda en las colectas.

A mi comité tutorial y predoctoral Drs. Javier Mijangos Cortés, Daniel Debouck, Ivón Ramírez Morillo, María Isabel Chacón, Felipe Sánchez Teller, María Azucena Canto Aguilar.

A mis compañeros del laboratorio, compañeros del postgrado y de la Unidad de Recursos Naturales.

ÍNDICE GENERAL	PÁGINA
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
CAPÍTULO I.....	5
INTRODUCCIÓN.....	5
ANTECEDENTES.....	7
La domesticación de plantas.....	7
Domesticación de las plantas en Mesoamérica.....	8
Modelo de estudio: <i>Phaseolus lunatus</i> L.....	11
Origen y domesticación del frijol Lima (<i>Phaseolus lunatus</i>).....	14
Domesticación del acervo génico mesoamericano de <i>Phaseolus lunatus</i> ..	16
Domesticación múltiple en el acervo génico mesoamericano del frijol Lima	18
Efecto fundador en el acervo génico mesoamericano del frijol Lima.....	19
Marcadores moleculares como herramientas para estudiar la domesticación en plantas.....	20
Secuencias de ADN.....	20
Marcadores microsatélites (SSR).....	21
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	22
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVOS.....	24
Objetivo general.....	24
Objetivos específicos.....	24

	PÁGINA
EXTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	24
BIBLIOGRAFÍA.....	25
CAPÍTULO II. MULTIPLE DOMESTICATIONS OF THE MESOAMERICAN GENE POOL OF LIMA BEAN (<i>Phaseolus lunatus</i> L.): EVIDENCE FROM CHLOROPLAST DNA SEQUENCES.....	35
ABSTRACT.....	35
INTRODUCTION.....	36
MATERIALS AND METHODS.....	39
Plant material.....	39
DNA extraction and amplification.....	39
DNA sequencing.....	40
Data analyses.....	40
Relationships, genetic structure and domestication of Lima bean.....	40
Genetic diversity and founder effect in Lima bean.....	41
RESULTS.....	41
Sequence analysis of chloroplast spacers <i>trnL-trnF</i> and <i>atpB-rbcL</i>	41
Chloroplast haplotypes in wild and domesticated Lima beans.....	41
Organization of genetic diversity of <i>P. lunatus</i> in its natural range.....	43
Ancestral haplotypes and their geographical distribution.....	46
Genetic structure.....	49
Genetic diversity and founder effect in Lima bean.....	50
DISCUSSION.....	51
Patterns of variation in <i>trnL-trnF</i> and <i>atpB-rbcL</i> in <i>P. lunatus</i>	51

	PÁGINA
Organization of genetic diversity of <i>P. lunatus</i> in its natural distribution area.....	52
Lima bean domestication.....	53
Genetic diversity and founder effect in Lima bean.....	57
CONCLUSIONS	58
ACKNOWLEDGEMENTS	59
REFERENCES	59
CAPÍTULO III. RELACIONES GENÉTICAS ENTRE POBLACIONES SILVESTRES Y DOMESTICADAS DEL ACERVO GÉNICO MESOAMERICANO DEL FRIJOL LIMA (<i>Phaseolus lunatus</i> L.): IMPLICACIONES SOBRE SU DOMESTICACIÓN	69
INTRODUCCIÓN	69
MATERIALES Y MÉTODOS	71
Selección del material vegetal.....	71
Extracción de ADN.....	72
Amplificación de microsatélites y electroforesis.....	72
ANÁLISIS DE DATOS	73
Relaciones y estructura genética del acervo génico mesoamericano de <i>P. lunatus</i>	73
Diversidad genética y efecto fundador en el acervo génico mesoamericano del frijol Lima (<i>P. lunatus</i>).....	75
RESULTADOS	75
Relaciones genéticas del acervo génico mesoamericano de <i>Phaseolus lunatus</i>	75

	PÁGINA
Distribución geográfica de las accesiones silvestres y domesticadas del acervo génico mesoamericano del frijol Lima.....	78
Estructura genética en el acervo génico mesoamericano del frijol Lima....	79
Diversidad genética en el acervo génico mesoamericano del frijol Lima...	80
DISCUSIÓN	82
Relaciones genéticas entre accesiones silvestres y domesticadas del acervo génico mesoamericano del frijol Lima.....	83
Diversidad genética y efecto fundador en el acervo génico mesoamericano del frijol Lima.....	85
Implicaciones en el proceso de domesticación.....	87
BIBLIOGRAFÍA	89
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES	97
Elección de los marcadores apropiados para el estudio.....	97
Domesticación del acervo génico mesoamericano del frijol Lima.....	98
PERSPECTIVAS	102
BIBLIOGRAFÍA	102
ANEXOS	107
ANEXO 1. Geographic localización, haplotype, and gene pool belong to wild and domesticated accessions of <i>Phaseolus lunatus</i> used in the present study.....	107
ANEXO 2. Ubicación geográfica de 150 accesiones silvestres y domesticadas del acervo génico Mesoamericano del frijol Lima evaluadas con 10 loci de microsatélites.....	114

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

CAPÍTULO I

Figura 1. Probables rutas de migración inicial humana hacia Mesoamérica a través de corredores de los Ríos: (1) Grande de Santiago-Lerma. (2) Armería-Tuxcacuesco. (3) Balsas. (4) Amacuzac, (5) Mexcala-Nexpa-Atoyac y principales sitios de establecimiento de los primeros grupos humanos que ingresaron a América (A) Chapala-Zacoalco-Sayula. (B) Valle de México y (C) Puebla Balsequillo. (Modificado de Zizumbo-Villareal y Colunga-García Marín 2010).....	9
Figura 2. Centros de domesticación propuestos para algunos cultivos de origen mesoamericano.....	11
Figura 3. Zonas de distribución geográfica de <i>Phaseolus lunatus</i> L. (Modificado de Biodiversity International IRRI, CIAT, 2009).....	13
Figura 4. Distribución geográfica del acervo génico mesoamericano de <i>Phaseolus lunatus</i> . (Modificado de Gutiérrez-Salgado <i>et al.</i> , 1995).....	17

CAPÍTULO II

Figure 5. Tree obtained with the maximum likelihood method using 262 accessions of <i>Phaseolus lunatus</i> L., and two cpDNA spacers <i>trnL-trnF</i> and <i>aptB-rbcL</i> . (a) MI group, (b) AI and MII groups. MI and MII = groups of Mesoamerican gene pool, AI = Andean gene pool.....	45
Figure 6. Geographic distribution of wild and domesticated accessions of gene pools of <i>P. lunatus</i> in America based on the groups observed in the maximum likelihood tree.....	47
Figure 7. Haplotype network of cpDNA showing the relationships between wild and domesticated accessions of <i>P. lunatus</i>	48

CAPÍTULO III

Figura 8. Relaciones genéticas entre 150 poblaciones silvestres y domesticadas del acervo génico mesoamericano del frijol Lima.....	76
--	----

	PÁGINA
Figura 9. Análisis de coordenadas principales entre accesiones silvestres y domesticadas del acervo génico mesoamericano del frijol Lima.....	78
Figura 10. Mapa de distribución geográfica de los grupos observados al interior del acervo génico mesoamericano del frijol Lima usando marcadores SSRs.....	80

ÍNDICE DE CUADROS
PÁGINA**CAPÍTULO I**

Cuadro 1. Comparación de las características que diferencian a los marcadores SSR de otros marcadores moleculares.....	22
---	----

CAPÍTULO II

Table 2. Geographic distribution of cpDNA haplotypes observed in wild accessions of lima bean.....	42
Table 3. Geographic distribution of cpDNA haplotypes observed in domesticated accessions of lima bean. MI, MII and AI groups are defined according to Serrano-Serrano et al. (2010).....	44
Table 4. Geographic distribution of haplotypes with major frequency G, T and H. and ancestral haplotypes G and T found in wild and domesticated accessions of Mesoamerican gene pool of lima bean.....	49
Table 5. Indices of genetic diversity in the groups observed in the lima bean including wild and domesticated accessions, calculated from cpDNA sequences.....	50
Table 6. Indices of genetic diversity and founder effect in wild and domesticated accessions of lima bean, calculated from cpDNA sequence data.....	51

CAPÍTULO III

Cuadro 7. Características de los diez pares de iniciadores microsatélite amplificados con la técnica de PCR, utilizados en el estudio.....	73
Cuadro 8. Resultados de riqueza alélica y diversidad genética a nivel de acervo génico y grupos observados en el acervo génico mesoamericano del frijol Lima, mediante 10 loci de microsatélites.....	81
Cuadro 9. Estimadores de diversidad genética en las poblaciones silvestres y domesticadas del acervo génico mesoamericano del frijol Lima. usando 10 loci de microsatélites.....	82

RESUMEN

El frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L., Fabaceae) es una de las cinco especies de frijol de gran importancia alimentaria que ha sido domesticada dentro del género *Phaseolus*. Presenta una amplia distribución geográfica que va desde el norte de México hasta el norte de Argentina en su forma silvestre y desde el suroeste de Estados Unidos hasta la costa oriental de Brasil en su forma domesticada. Dos acervos génicos han sido propuestos dentro de la especie: el mesoamericano (GM) y el andino (GA), ambos conteniendo tanto formas silvestres y domesticadas, lo que ha llevado a sugerir la existencia de dos eventos de domesticación que involucran a estos dos acervos. El centro de domesticación del acervo GA ha sido localizado entre Ecuador y Perú. El centro de domesticación del acervo GM aún no ha sido localizado y estudios recientes han señalado la existencia de dos grupos al interior de GM: MI y MII, sugiriéndose hasta ahora solo un evento de domesticación para MI en el centro-occidente de México. Los objetivos de esta investigación fueron: a) encontrar el centro de domesticación del acervo génico mesoamericano del frijol lima, b) determinar si la domesticación de este acervo fue un evento único o múltiple, c) aportar evidencias sobre la existencia de un efecto fundador en las formas domesticadas. Para el logro de estos objetivos se utilizaron dos marcadores provenientes de genomas distintos: secuencias de ADN de cloroplasto (los espaciadores intergénicos *atpB-rbcL* y *trnL-trnF*) usando 262 accesiones y marcadores nucleares (10 loci de microsatélites) usando 150 accesiones. Los datos fueron analizados mediante enfoques filogeográfico y de genética de poblaciones, respectivamente. Los resultados confirman la existencia de dos grupos diferenciados genética y geográficamente dentro del acervo génico mesoamericano del frijol Lima: MI y MII. Se confirma como área de domesticación para MI el nor-occidente y centro-occidente de México, principalmente la región que ocupan los actuales estados de Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán y Guerrero en la provincia biogeográfica denominada Nayarit-Guerrero. Para MII se propone como centro de domesticación el área comprendida entre Guatemala, Honduras y Costa Rica. Los resultados confirman la existencia de un efecto fundador en las accesiones domesticadas del acervo génico mesoamericano del frijol Lima como consecuencia de su domesticación.

ABSTRACT

Lima bean (*Phaseolus lunatus* L., Fabaceae) is one of the five domesticated species of great importance in the genus *Phaseolus*; and it is widely distributed from northern Mexico to northern Argentina in its wild forms and from the southern United States to the east coast of Brazil in its domesticated forms. Two gene pools have been proposed within *P. lunatus*: The Mesoamerican (MG) and Andean (AG) gene pools both have wild and domesticated forms, which have led to suggest two independent domestication events that involve the gene pools aforementioned. The domestication area of AG has been located between Ecuador and Peru. The domestication area of the MG has not yet been localized and recent studies have indicated two groups within MG: MI and MII suggesting a single domestication event for MI in central-western of Mexico. The objectives of this research were: a) to find the domestication center of Mesoamerican genepool of Lima bean, b) determine whether the domestication of this genepool was a single or multiple event, c) provide evidence on the existence of a founder effect and d) analyze the dispersion of cultivated mesoamerican forms pos-domestication. For this purpose we used two markers from different genomes, chloroplast DNA sequences (intergenic spacer) and nuclear markers (SSR microsatellite). 262 accesions of Lima bean were evaluated, with two intergenic spacers of DNA chloroplast *atpB-rbcL* and *trnL-trnF*, and 150 accesions were evaluated with 10 microsatellite loci (SSR). Data were analyzed with two approaches: phylogeographic and population genetics respectively. Both approaches, confirmed the existence of two groups MI and MII, each one represented by an ancestral haplotype and a specific geographic distribution. North-west and central-west of Mexico is proposed as domestication center of MI, particularly the area occupied by the states of Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacan and Guerrero in the biogeographic province named Nayarit-Guerrero. In order to MII the area between Guatemala, Honduras y Costa Rica is proposed as domestication center. This research confirmed the existence of a founder effect for the Mesoamerican gene pools as a result of domestication.

INTRODUCCIÓN

La domesticación de plantas es sin duda uno de los procesos evolutivos más importantes a nivel mundial debido, a que ha permitido el surgimiento y mantenimiento de la civilización humana en los últimos 10,000 años (Diamond, 2002). Este proceso es el resultado de la fuerza de selección realizada por el hombre que conduce a la obtención de plantas con características deseadas para su utilización y manejo agrícola por el humano en diferentes ambientes, siendo favorecida o limitada por el sistema de reproducción y la constitución genética de las plantas (Diamond, 1997; Harlan, 1992). Mediante este proceso evolutivo los cultivares o variedades locales emergen de sus progenitores silvestres, siendo las especies silvestres la base genética de las variedades locales y las variedades locales a su vez, la base genética de los cultivares modernos (Gepts, 2004; Zohary, 1999; Harlan, 1992). Al estudiar la domesticación de las plantas, estudios previos han demostrado que algunos cultivos han sido derivados de un solo evento de domesticación, como es el caso del maíz (*Zea mays* L.; Buckler *et al.*, 2006; Matsuoka *et al.*, 2002). Por otro lado, los procesos de domesticación múltiple en tiempo y espacio, han sido uno de los factores clave en la estructuración de la diversidad genética presente en los cultivos modernos. En América, ejemplos de estos eventos son los chiles (*Capsicum* spp.), calabazas (*Cucurbita* spp.), algodón (*Gossypium* spp.) y frijoles (*Phaseolus* spp.) (Chacón *et al.*, 2005; Diamond, 1997; Harlan, 1992). Procesos de domesticación múltiple en diferentes poblaciones de la misma especie son raros, pero también han sido documentados, este es el caso para el frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L.; Motta-Aldana *et al.*, 2010; Serrano-Serrano *et al.*, 2010; Maquet *et al.*, 1997; Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995).

El frijol Lima (*P. lunatus*) es una de las cinco especies domesticadas del género *Phaseolus* y la segunda especie más importante después del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.; Baudoin *et al.*, 2004). Es una especie originaria de América y ha evolucionado en los trópicos del nuevo mundo por más de 10.000 años (Kaplan y Lynch, 1999). Las formas domesticadas tienen gran importancia en América tropical, principalmente en regiones donde se practica la agricultura tradicional (Baudoin, 1991). Evidencias de tipo morfológico (Debouck *et al.*, 1987), bioquímico (Lioi y Galazo, 2002; Lioi *et al.*, 1999;

Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995), paleobotánico (Kaplan y Lynch, 1999; Kaplan y Kaplan, 1988; Kaplan, 1965) y moleculares (Motta-Aldana *et al.*, 2010; Serrano-Serrano *et al.*, 2010; Maquet *et al.*, 1997) indican la existencia de dos principales acervos génicos para el frijol Lima: el andino y el mesoamericano, ambos conteniendo tanto formas silvestres (*P. lunatus* var. *silvester*) como domesticadas (*P. lunatus* var. *lunatus*); además de la existencia de un pequeño grupo de genotipos intermedios entre ambos acervos (Fofana *et al.*, 1999; Maquet *et al.*, 1999; Lioi *et al.*, 1998; Maquet y Baudoin, 1997; Debouck *et al.*, 1987).

El centro de domesticación del acervo génico andino ha sido ubicado en los valles occidentales de altitud media entre Ecuador y el norte del Perú, con base en la presencia de poblaciones silvestres de dicho acervo (Motta-Aldana *et al.*, 2010; Maquet *et al.*, 1999; Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995). Con respecto al acervo mesoamericano, se considera que fue domesticado en Mesoamérica. Sin embargo, las formas silvestres de este acervo se distribuyen desde México hasta Formosa, Argentina y las formas domesticadas desde el suroeste de los Estados Unidos hasta la costa oriental de Brasil (Serrano-Serrano *et al.*, 2010; Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995; Debouck *et al.*, 1987). Esta distribución tan amplia, así como la carencia de colectas de material silvestre en algunas zonas de su distribución natural (en las costas del Pacífico y Golfo de México, el departamento Petén en Guatemala y la región de Suramérica), han dificultado encontrar hasta ahora el centro de domesticación del acervo génico mesoamericano. Recientemente, evidencias bioquímicas (Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995) y moleculares (Serrano-Serrano *et al.*, 2012; Motta-Aldana *et al.*, 2010) indican que este podría encontrarse entre el centro occidente y el sureste de México (más específicamente en el norte y nor-occidente del Istmo de Tehuantepec) y norte de Guatemala, e incluso que podría haber más de un evento de domesticación. Considerando lo anterior, el objetivo general de la presente propuesta es aportar evidencias sobre el proceso de domesticación del acervo génico mesoamericano del frijol Lima, mediante el uso de dos herramientas moleculares: marcadores microsatélites (SSR) de ADN de núcleo y dos espaciadores intergénicos de ADN de cloroplasto correspondientes a los marcadores *atpB-rbcL* y *trnL-trnF*. Ambas técnicas han mostrado su utilidad en estudios de domesticación usando diferentes enfoques metodológicos.

ANTECEDENTES

La domesticación de plantas

El término domesticación proviene del Latín *domus* que significa “casa, hogar”, “lugar de habitación” o “llevar a casa” y hace alusión al hecho de llevar una población silvestre, o población fundadora, cerca del lugar donde vive el hombre como es el campo de cultivo o el traspatio (Harlan, 1992). Tradicionalmente, la domesticación de plantas ha sido considerada como un proceso evolutivo unidireccional, en el cual las poblaciones silvestres fundadoras son las que responden (a través de cambios genéticos) a la acción ejercida por el hombre (selección artificial). Sin embargo, la domesticación podría ser también considerada como un proceso complejo de co-dependencia entre el hombre y las plantas que comienza con una interacción o asociación cercana entre éstos y en varios casos culmina en una mutua y total interdependencia (Chacón, 2009). Durante el proceso de domesticación, de manera consciente o inconsciente, los humanos provocaron una serie de cambios en las características morfológicas y fisiológicas de las plantas domesticadas que las diferenciaron de sus parientes silvestres, permitiendo su adaptación al cultivo y al consumo, pero provocaron la disminución o pérdida de su capacidad de supervivencia en condiciones naturales, pasando a depender del humano. Al conjunto de características morfológicas y fisiológicas adquiridas por las plantas domesticadas se les conoce como el síndrome de domesticación (Doebley *et al.*, 2006; Gepts, 2004; Harlan, 1992). Las dos características más importantes dentro del síndrome de domesticación en plantas propagadas por semilla son: 1) la pérdida del mecanismo de dispersión, la cual evita la liberación de la semilla y 2) la pérdida de latencia de la semilla, beneficiando con ello una germinación simultánea y una población más uniforme en su ciclo de crecimiento vegetativo y productivo, ambos factores favorecen una cosecha más uniforme (Pickersgill, 2007; Hammer, 1984). Otras características del síndrome de domesticación en plantas son: a) el cambio en el hábito de crecimiento, generalmente las plantas domesticadas presentan un hábito de crecimiento determinado en comparación al indeterminado presentado por sus parientes silvestres, b) reducción en los niveles de toxicidad, c) cambio en el sistema reproductivo de las plantas, por lo general se favorece una mayor autopolinización de los cultivos o la generación de la reproducción vegetativa, d)

cambios bioquímicos y e) cambios en el tamaño de los órganos cosechados (de menor a mayor) de las poblaciones silvestres a las domesticadas (Fuller, 2007; Gepts, 2004; Smartt, 1988).

Domesticación de las plantas en Mesoamérica

Se ha planteado que la domesticación de plantas y el origen de la agricultura, se desarrollaron de forma independiente en seis regiones diferentes alrededor del mundo entre los 11,000 y 5,000 años antes del presente (A.P.): los Andes de América del sur, suroeste de Asia, África, el sur de China, el sureste de Asia y Mesoamérica (Smith, 2005; Gepts, 2004; Smartt y Simmonds, 1995; Harlan, 1992; Hawkes, 1983); en áreas tropicales y subtropicales donde se presenta alta biodiversidad a partir de la cual los grupos de cazadores-recolectores iniciaron un largo proceso de selección y manejo que condujo a la domesticación de plantas y animales (Smith, 2005; Gepts, 2004).

Para el caso del centro de domesticación Mesoamericano, Dixon (2001) con base en datos geológicos y arqueológicos, sugiere que los primeros grupos humanos llegaron a Mesoamérica aproximadamente hace 11,500 A.P., llegando a los lagos ubicados en las cercanías del eje transversal neovolcánico en México. Estos grupos humanos ingresaron por la costa del Pacífico habiendo desarrollado tecnología para la caza de pequeños mamíferos, siguiendo los ríos Santiago-Lerma y Balsas-Mezcala, y estableciéndose en los sistemas lacustres de Chapala-Sayula-Zacoalco, valle de México y valle de Puebla (Zizumbo-Villarreal y Colunga-García Marín, 2010). Posteriormente (aproximadamente 10,600 A.P.), nuevos grupos llegaron procedentes del suroeste y las grandes planicies de lo que ahora es Estados Unidos de América, estos grupos humanos se distribuyeron a lo largo de los ríos, entre los sistemas lacustres interiores y en la costa del Pacífico (Figura 1; Zizumbo Villarreal y Colunga-García Marín, 2010; Zizumbo Villarreal y Colunga-García Marín, 2008; Dixon, 2001). Durante el tiempo de su dispersión, a través de las selvas bajas caducifolias en las planicies y las selvas medianas perennifolias en el lecho de los ríos, éstos grupos humanos llegaron a conformar una cultura de supervivencia basada en la recolección de plantas, la caza de animales pequeños, el consumo de granos molidos, el consumo de tallos y hojas de agaves cocidos y legumbres, utilizando una tecnología de piedra para el quebrado, el molido y el asado (Piperno *et al.*, 2007; Metcalfe, 2006; Poinar,

2001; Willis, 1995; Doebley, 1984). Considerando lo anterior, la domesticación de plantas en Mesoamérica pudo haberse iniciado de muchas maneras: a) a través de la observación del consumo de frutos y granos que hacía la fauna silvestre, b) mediante el uso del fuego para la producción de biomasa, c) a través de la selección recurrente de plantas realizada por el humano, el cultivo y la constitución genética de las especies que ayudaron a la fijación de alelos asociados a objetivos antropocéntricos, factores que impactaron en la evolución de las plantas llevándolas a la domesticación (Casas *et al.*, 2007; Jaenicke y Smith, 2006; Gepts, 2004).



Figura 1. Probables rutas de migración inicial humana hacia Mesoamérica a través de corredores de los Ríos: (1) Grande de Santiago-Lerma. (2) Armería-Tuxcacuesco. (3) Balsas. (4) Amacuzac, (5) Mexcala-Nexpa-Atoyac y principales sitios de establecimiento de los primeros grupos humanos que ingresaron a América (A) Chapala-Zacoalco-Sayula. (B) Valle de México y (C) Puebla Balsequillo (Modificado de Zizumbo-Villareal y Colunga-García Marín, 2010).

La aplicación de marcadores bioquímicos y moleculares, en combinación con el registro arqueobotánico y la datación con carbono, han permitido especificar con mayor detalle los posibles centros de domesticación e incluso en algunos casos, lugares

específicos de domesticación para ciertos cultivos. Para el caso de las principales especies domesticadas en Mesoamérica, por ejemplo, los registros arqueobotánicos indican que la calabaza (*Cucurbita pepo* L.) fue la primera planta domesticada con un registro aproximado de 7,900 años A.P. (Gepts, 2004; Smith, 1997), localizando su centro de domesticación en la misma región del suroeste de México donde se domesticó el maíz, en las áreas de Guerrero, Michoacán y sur de Jalisco (Sanjur et al., 2002). En el caso del maíz (*Zea mays*), Matsuoka et al. (2002) utilizaron microsatélites nucleares, y sugirieron que la diferenciación entre poblaciones domesticadas y silvestres se inició hace aproximadamente 9,000 años A.P. Estudios realizados tanto con microsatélites como con haplotipos de cloroplasto señalan como posible centro de domesticación del maíz, el área de la cuenca del Balsas en la porción que abarca los estados de Guerrero, Michoacán y Jalisco (Buckler et al., 2006; Fukunaga et al., 2005). En lo que respecta al frijol común (*Phaseolus vulgaris*), los registros arqueológicos señalan la presencia de formas domesticadas entre 8,000 y 6,000 años A.P. (Perry y Flannery, 2007; Smith, 1989). Sin embargo, los fechamientos directos en las semillas indican sólo 2,285 años A.P. (Kaplan y Lynch, 1999). Los análisis fenéticos utilizando como marcador molecular la *faseolina*, una proteína de reserva de la semilla, así como análisis filogenéticos con microsatélites nucleares, indican que la posible área de domesticación del frijol común incluye la cuenca baja del río Lerma, el río Grande de Santiago, el río Verde y el río Mascota-Ameca, en las cercanías del sistema Chapala-Saluya-Zacualco (Figura 2; Kwak et al., 2009; Gepts, 1988). Por su parte, Miller y Schaal (2005) propusieron el centro occidente de México y El Salvador como centros de domesticación del jocote (*Spondias purpurea* L.). Además, dentro de esta gran región se considera que pudo haber sido domesticado el acervo génico mesoamericano del frijol Lima (*Phaseolus lunatus*; Motta-Aldana et al., 2010; Fofana et al., 2001; Gutiérrez-Salgado et al., 1995). Precisar dentro de este vasto territorio donde se domesticó el frijol Lima, es relevante desde la perspectiva biológica y agronómica para conocer las condiciones ambientales donde se llevó a cabo este proceso, localizar núcleos de los recursos fitogenéticos del frijol Lima que podrían ser útiles para estudios de conservación y mejoramiento genético y establecer los procesos que pudieron estar involucrados en la domesticación de este cultivo (Gepts, 2008; 2006).



Figura 2. Centros de domesticación propuestos para algunos cultivos de origen mesoamericano.

Modelo de estudio: *Phaseolus lunatus* L.

El frijol Lima (*Phaseolus lunatus*) es una de las cinco especies de frijol pertenecientes al género *Phaseolus* que ha sido domesticada y representa, después del frijol común (*P. vulgaris*), la segunda leguminosa alimenticia más importante del género. Es una planta herbácea con hábito de crecimiento trepador y un sistema de apareamiento mixto, esto es, principalmente autógama pero se han reportado porcentajes de alogamia hasta de 48% (Baudoin *et al.*, 2004; Fofana *et al.*, 1999; Maquet *et al.*, 1995; Baudoin, 1991).

En cuanto a su clasificación taxonómica, el frijol Lima pertenece al reino *Plantae*, división *Angiospermae*, clase *Eudicotiledóneas*, subclase *Rosidas* (*Rosidae*), orden *Fabales*, familia *Fabaceae* (leguminosas), género *Phaseolus* L. y especie *P. lunatus* L. (APG III, 2009).

Actualmente, el frijol Lima se distribuye en América, Asia y África, en una zona comprendida entre las latitudes 45° norte y 35° sur. Su área de distribución natural está en

América tropical en climas semi-cálidos de tipo oceánico continental y mediterráneo, así como tropicales húmedos semiáridos y en ciertos casos áridos y en diversos tipos de suelos (Lopez-Soto *et al.*, 2005; Baudoin *et al.*, 2004; Baudoin, 1988). El frijol Lima se encuentra en forma abundante en México (en zonas tropicales y subtropicales de las vertientes del Atlántico y del Pacífico), en toda América Central, en las Antillas y de forma discontinua en América del Sur (Debouck, 2008; Figura 3). Las poblaciones silvestres están ampliamente distribuidas en zonas tropicales y subtropicales, desde el nivel del mar hasta los 2,000 m, asociadas principalmente con vegetación secundaria o claros derivados de bosque tropical caducifolio, bosque tropical subcaducifolio y bosque tropical perennifolio, las poblaciones silvestres de clima templado se encuentran en vegetación tipo *Quercus*, coníferas y bosque mesófilo de montaña coexistiendo con las plantas cultivadas en praderas, cultivos permanentes y milpas (Ballesteros, 1999).

En cuanto a precipitación, el frijol Lima prospera en áreas húmedas o subhúmedas tropicales, con precipitación anual entre 900 y 1,500 mm o por encima de los 1,500 mm; aunque es tolerante a la sequía y puede crecer en áreas con precipitaciones entre los 500 y 600 mm (Ballesteros, 1999).



Figura 3. Zonas de distribución geográfica de *Phaseolus lunatus* L. (Modificado de Biodiversity International IRRI, CIAT, 2009).

Origen y domesticación del frijol Lima (*Phaseolus lunatus*)

Originalmente, Linneo asignó un origen asiático a *P. lunatus*. Sin embargo, hoy día es ampliamente aceptado su origen Neotropical (Baudoin *et al.*, 2004; Fofana *et al.*, 1999; Maquet *et al.*, 1995; Baudoin, 1991; Debouck, 1986).

Una hipótesis sobre el origen de esta especie sugiere que dos principales linajes del género *Phaseolus* (*P. vulgaris* y *P. lunatus*) pudieron haberse originado de dos formas ancestrales, llamadas A y B respectivamente. Tales formas ancestrales pudieron haber evolucionado en México-Centroamérica, región que se considera centro de origen o especiación del género en donde actualmente existen aproximadamente 40 especies (Delgado *et al.*, 1993; Delgado, 1985; citados por Fofana *et al.*, 1999). La forma ancestral B que involucra a *P. lunatus*, habría migrado hacia Sur América, dejando atrás especies como: *P. maculatus*, *P. salicifolius*, *P. polystachyus*, *P. marechalii*, *P. xolocotzii*, entre otras. Esta forma ancestral B habría alcanzado las tierras altas andinas y, después de un evento de especiación simpátrica, dio origen a *P. augusti*, *P. pachyrrhizoides*, *P. bolivianus* y *P. lunatus*, sugiriendo así un origen Andino para el frijol Lima por sus relaciones más cercanas entre sus formas andinas y sus parientes silvestres andinos (Fofana *et al.*, 1999). Estos autores también sugirieron que las variantes mesoamericanas de *P. lunatus* pudieron haberse derivado de uno de los parientes silvestres andinos debido a que sus patrones de proteína de ambos grupos son muy similares (Maquet y Baudoin, 1996; citados por Fofana *et al.*, 1999). Esta hipótesis es corroborada por Serrano-Serrano *et al.* (2010), quienes mediante secuenciación de espaciadores intergenéticos de ADN de cloroplasto y espaciadores intergénicos transcritos (ITS) de ADN nuclear, concluyen que el frijol Lima es de origen andino.

La evidencia de tipo morfológica (Esquivel *et al.*, 1993; Baudet, 1977), bioquímica (Lioi y Galazo, 2002; Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995) y molecular (Motta-Aldana *et al.*, 2010; Serrano-Serrano *et al.*, 2010; Fofana *et al.*, 2001; Fofana *et al.*, 1999; Maquet *et al.*, 1999), han permitido reconocer dos principales acervos génicos para el frijol Lima: el mesoamericano y el andino, ambos conteniendo tanto formas silvestres como domesticadas, así como un pequeño grupo de genotipos intermedios que comparten

características de ambos acervos. Baudet (1977), consideró que dentro de la especie las formas silvestres se diferencian de las domesticadas por la pequeñez de sus granos y vainas, y les atribuyó el rango de variedades botánicas, proponiendo la siguiente clasificación: *Phaseolus lunatus* L. var. *silvester* Baudet para los silvestres y *Phaseolus lunatus* L. var. *lunatus* Baudet para los domesticados. Este autor incluyó dentro de la variedad domesticada tres cultigrupos (cv-gr): el Sieva compuesto de semillas planas y de tamaño intermedio y el Papa compuesto de semillas redondas y pequeñas, ambos pertenecientes al acervo génico mesoamericano y el gran Lima compuesto por semillas grandes y planas perteneciente al acervo génico andino.

Entre los trabajos que apoyan la existencia de los dos acervos génicos principales en el frijol Lima se pueden mencionar los siguientes: Gutiérrez-Salgado *et al.* (1995), basados en una revisión de la distribución geográfica de la especie, así como en un análisis morfológico y de proteína de semilla encontraron dos patrones electroforéticos de proteína de semilla principales: el mesoamericano (M) y el andino (A). Maquet *et al.* (1997), al estudiar la estructura genética de una colección base del frijol Lima usando marcadores de aloenzima, confirmaron la existencia de los dos acervos génicos caracterizados por alelos específicos. Estos resultados fueron corroborados por Lioi *et al.* (1998), quienes con parámetros de diversidad de isoenzimas y el Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), observaron una clara separación de los dos principales acervos génicos. Estos autores también observaron la presencia de un grupo de genotipos intermedios entre ambos acervos. Resultados similares fueron reportados por Fofana *et al.* (2001), al estudiar la diversidad del frijol Lima por medio de dos sondas de ADN de cloroplasto usando enzimas de restricción. Los resultados de Lioi y Galazo (2002), al usar oligonucleótidos de ADN para revelar el polimorfismo en *P. lunatus*, concuerdan con lo reportado por Maquet *et al.* (1997) y Gutiérrez-Salgado *et al.* (1995). Además, el estudio de Lioi y Galazo (2002) apoyaron la presencia de un grupo menor de genotipos intermedios genéticamente distintos. Serrano-Serrano *et al.* (2010), al utilizar marcadores de ADN de cloroplasto e ITS, además de corroborar la existencia de los dos principales acervos génicos (mesoamericano y andino), proponen la existencia de dos grupos genéticamente diferenciados al interior del acervo génico mesoamericano llamados MI y MII, resultados que fueron confirmados por otros autores (Serrano-Serrano *et al.*, 2012; Motta-Aldana *et al.*, 2010).

En cuanto al proceso de domesticación del frijol Lima, Debouck *et al.* (1987) discutieron los resultados de dos viajes de colecta de germoplasma de *P. lunatus* realizados en las provincias de Cajamarca y Amazonas Perú, y con base en las similitudes en tamaño de las semillas colectadas con respecto a la descrita por Kaplan encontrada en sitios arqueológicos en Huaylas, Ancash, Perú, sugirieron que el frijol Lima fue domesticado en Perú. Esquivel *et al.* (1993) usando datos morfológicos y bioquímicos analizaron los patrones de proteína de semilla y sugirieron que la domesticación del frijol Lima pudo haberse iniciado en Cuba. Por otro lado, Maquet *et al.* (1997) usaron marcadores de aloenzima y señalaron que el frijol Lima fue domesticado en dos centros, uno ubicado entre Ecuador y norte de Perú y el segundo en Mesoamérica. Resultados similares fueron reportados por Fofana *et al.* (2001) al estudiar la diversidad genética del frijol Lima usando marcadores de ADN de cloroplasto. Estos autores sugirieron la existencia de tres centros primarios de diversidad genética y domesticación y un punto de diversificación secundario: el primer centro de diversidad genética y domesticación lo ubicaron en la vertiente occidental de los Andes, el segundo en la zona comprendida entre México y Guatemala extendiéndose a las islas del Caribe y el Istmo de Panamá, y el tercer centro o grupo de diversidad genética fue localizado en la región que cubre el norte de Perú, norte de Colombia, norte de Ecuador y el occidente de Venezuela. El punto secundario de domesticación lo ubicaron hacia el norte de Argentina. Sin embargo, también mencionaron que éste puede ser una extensión del acervo génico mesoamericano. Por otro lado, estudios más recientes (Serrano-Serrano *et al.* 2012; Motta-Aldana *et al.*, 2010; Serrano-Serrano *et al.*, 2010), en donde se utilizaron marcadores de ADN de cloroplasto (*trnL-trnF* y *atpB-rbcL*) e ITS de ADN nuclear, dan soporte a la existencia de estos dos centros de domesticación independientes: uno en Sur América y otro en Mesoamérica.

Domesticación del acervo génico mesoamericano de *Phaseolus lunatus*

El acervo génico mesoamericano del frijol Lima se considera que fue domesticado en Mesoamérica. Sin embargo, las formas silvestres de este acervo se distribuyen desde México hasta Argentina y las formas cultivadas desde el suroeste de los Estados Unidos hasta la costa oriental de Brasil (Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995; Debouck *et al.*, 1987). Debido a esta distribución tan amplia (Figura 4) y a la carencia de material colectado en

áreas clave de su distribución, el centro de domesticación de este acervo no ha sido encontrado aún y sólo algunas hipótesis han sido sugeridas.



Figura 4. Distribución geográfica del acervo génico mesoamericano de *Phaseolus lunatus*. (Modificado de Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995).

Makie (1943), basado en la presencia de poblaciones silvestres en Guatemala, sugirió a ésta región como el posible centro de domesticación del acervo génico mesoamericano del frijol Lima, mientras que Kaplan (1965) basado en evidencia arqueobotánica, sugirió a las planicies costeras del Pacífico de Oaxaca y Guerrero como posible centro de domesticación del cultigrupo Sieva. Por otro lado, Gutiérrez-Salgado *et al.* (1995) al estudiar los patrones electroforéticos de proteínas de semilla sugirieron a la región ubicada entre el oriente del Istmo de Tehuantepec (México) y norte de Guatemala,

como posibles sitios de domesticación. Fofana *et al.* (2001) indicaron a la zona comprendida entre México y Guatemala extendiéndose a las islas del Caribe y el Istmo de Panamá como centro de domesticación de este acervo. Un dato muy importante a considerar es que actualmente la mayor diversidad de formas cultivadas en México se encuentra en la Península de Yucatán (Martínez-Castillo *et al.*, 2004; Ballesteros, 1999), región que también alberga una gran cantidad de poblaciones silvestres con altos niveles de diversidad genética, mayores a los reportados para las poblaciones silvestres de Costa Rica (Martínez-Castillo *et al.*, 2006). Sin embargo, Gutiérrez-Salgado *et al.* (1995) señalaron que la alta riqueza de formas cultivadas observadas en la Península de Yucatán pudo provenir de las tierras altas de Guatemala y Chiapas. Estudios más recientes basados en el polimorfismo de dos espaciadores intergénicos de ADN de cloroplasto y la región ITS del ADN nuclear (Motta-Aldana *et al.*, 2010) sugirieron que el área de domesticación del acervo génico mesoamericano del frijol Lima probablemente tuvo lugar en el occidente del centro de México y muy probablemente en el área del norte y noroeste del Istmo de Tehuantepec. Por su parte, Serrano-Serrano *et al.* (2012) estudiaron la domesticación del frijol Lima de México y con base en sus resultados sugirieron al centro occidente de México como posible área de domesticación, ubicando dicha domesticación más específicamente en la región de Nayarit-Jalisco o Guerrero-Oaxaca de éste país.

Domesticación múltiple en el acervo génico mesoamericano del frijol Lima

La amplia distribución geográfica del acervo génico mesoamericano, así como la gran diversidad de formas domesticadas existentes en este acervo, podrían indicar la existencia de eventos múltiples de domesticación al interior de este acervo. Existen muy pocos estudios que consideren esta interrogante. Gutiérrez-Salgado *et al.* (1995) señalaron que es difícil identificar áreas específicas de domesticación en este acervo ya que el patrón electroforético de semilla M1, el cual es el patrón observado con mayor frecuencia, es también el que posee la distribución geográfica más amplia. Por su parte, Lioi (1996) estudió la diversidad de *faseolina* del frijol Lima para determinar los patrones geográficos de variabilidad genética y encontró dos patrones de *faseolina*, sugiriendo con ello que al menos dos genotipos de este acervo estuvieron involucrados en un proceso de domesticación y distribución en toda América. Ballhorn *et al.* (2008) estudiaron la

interacción entre defensas directas e indirectas del frijol Lima mediante las características cianogénicas de las plantas y componentes volátiles orgánicos, en sus resultados no observaron agrupamientos claros entre las accesiones silvestres y domesticadas, e indicaron que el frijol Lima pudiera tener un origen de domesticación múltiple.

Efecto fundador en el acervo génico mesoamericano del frijol Lima

Como regla general, se acepta que las especies cultivadas han sufrido una disminución en su diversidad genética como resultado de un cuello de botella (efecto fundador) ocurrido durante su domesticación (Ladizinsky, 1985). Para el caso de *P. lunatus*, los diferentes estudios que han abarcado este tema no han generado hasta ahora resultados concluyentes. Gutiérrez-Salgado *et al.* (1995) señalaron que en el acervo génico mesoamericano del frijol Lima pudo haberse dado un efecto fundador y con ello una disminución de la diversidad genética en las formas domesticadas, en contraste con el acervo génico andino en el cual no se observó dicho efecto. Sin embargo, estos autores señalaron que sus hallazgos pudieron deberse a la limitada cantidad de accesiones silvestres andinas incorporadas en su estudio. Maquet *et al.* (1997), al estudiar la estructura genética del frijol Lima con marcadores de aloenzima, no observaron un efecto fundador a nivel de toda la especie ya que la diferencia observada en la diversidad genética entre las formas silvestres y domesticadas no fue significativa. Fofana *et al.* (1997) encontraron que existe un mayor nivel de variabilidad genética en las variedades domesticadas que en las formas silvestres dentro de los acervos génicos mesoamericano y andino, lo cual refuta la existencia de un efecto fundador. Estos autores señalaron que sus resultados podrían deberse al número bajo de accesiones silvestres analizadas en el estudio. Aunado a lo anterior, los estudios realizados por Martínez-Castillo (2005) sobre la diversidad, estructura y relaciones genéticas en el complejo silvestre-arvense-domesticado del frijol Lima en la península de Yucatán, indicaron niveles menores de diversidad genética en el acervo domesticado en comparación con el silvestre, apoyando la posible existencia de un efecto fundador. Motta-Aldana *et al.* (2010) encontraron una severa reducción en la diversidad genética en una muestra de 86 accesiones silvestres y domesticadas del acervo génico Mesoamericano e indicaron que pudo ser debida a un efecto fundador ocurrido durante la domesticación. Martínez-Castillo *et al.* (2011) y

Serrano-Serrano *et al.* (2012) reportaron una severa reducción en la diversidad genética de las poblaciones domesticadas del acervo génico mesoamericano del frijol Lima.

Marcadores moleculares como herramientas para estudiar la domesticación en plantas

Los marcadores de ADN o moleculares son polimorfismos detectados en la secuencia del ADN. Estos polimorfismos pueden detectarse en el ADN nuclear y en el ADN de los organelos ya sea en las mitocondrias o en los cloroplastos. Estos marcadores están basados en el análisis directo del genotipo de la planta, es decir afectan a la molécula de ADN y se consideran, por ello, medidas objetivas de la variación. No están sujetos a las influencias ambientales, las pruebas pueden realizarse en cualquier momento del desarrollo de las plantas y tienen el potencial de hallarse en número ilimitado porque abarcan todo el genoma, lo que representa su mejor atributo (Picca *et al.*, 2004; IPGRI, 2003; Karp y Edwards, 1997). Los marcadores moleculares pueden ser utilizados para realizar estudios de: a) parentesco genético y diversidad en genética de poblaciones, b) estudio del polimorfismo en razas locales y en cultivares, c) identificación de cultivares y taxonomía, d) estudios filogenéticos, e) estudios de domesticación y evolución, f) flujo de genes e introgresión y d) cartografía comparativa de genomas (Freeland, 2005; IPGRI, 2003; Soltis y Soltis, 1998; Karp y Edwards, 1997). Entre los marcadores más utilizados en estudios de evolución y domesticación, se encuentran las secuencias obtenidas a partir de ADN de cloroplasto y los microsatélites obtenidos a partir de ADN de núcleo.

Secuencias de ADN

Actualmente, los marcadores moleculares a partir de la variación de secuencias de ADN de cloroplasto (ADNcp) son los más usados para entender los procesos filogenéticos, poblacionales, evolutivos y de domesticación en plantas (Zeder *et al.*, 2006; Kress *et al.*, 2005; Taberlet *et al.*, 1991). El genoma del ADNcp es una molécula circular que se encuentra en múltiples copias en el cloroplasto, su tamaño típico se encuentra en un rango de 120 a 170 kilo pares de bases (kb), es de herencia uniparental y posee un grado relativamente alto de conservación en tamaño, estructura, contenido genético y orden

linear de los genes en las plantas (Borsch y Quant, 2003; Soltis y Soltis, 1998). Su estructura general posee cuatro regiones: una región larga de copia única (LSC), una región corta de copia única (SSC) y dos repeticiones invertidas (IR) conteniendo secuencias codificantes (genes) y no codificantes (intrones y espaciadores intergenéticos). Debido a que las repeticiones invertidas evolucionan en una tasa más baja en relación a las regiones de copia única, la mayoría de las regiones de cloroplasto utilizadas como marcadores moleculares están localizadas en la región larga de copia única (Shaw *et al.*, 2007; Perry y Wolfe, 2002). Entre las principales regiones no codificantes de ADNcp que han sido utilizadas en estudios filogenéticos, filogeográficos y de domesticación se mencionan las siguientes: intrones *rpl16*, *ndhA*, *3'trnK-matK*, *trnL* y los espaciadores intergenéticos *trnT-trnL*, *trnG-trnS*, *atpB-rbcL* y *trnL-trnF* entre otros (Shaw *et al.*, 2007, 2005; Taberlet *et al.*, 1991).

Diversos estudios han demostrado la utilidad de las secuencias de ADN como marcadores moleculares para estudiar la domesticación en plantas. Por ejemplo, en Yuca (*Manihot esculenta* subsp. *esculenta*, Crantz) los resultados al secuenciar el gen *G3pdh* han sido utilizados para reportar la región de la frontera sur de la cuenca del Amazonas como el sitio probable de domesticación de este cultivo (Olsen y Schaal, 1999). Los resultados obtenidos con el espaciador intergénico del ADNcp *trnG-trnS* permitieron demostrar domesticación múltiple en jocote (*Spondias purpurea*; Miller y Schaal, 2005). Otros estudios también han demostrado la utilidad de diferentes regiones del ADNcp para estudiar la domesticación en otras especies como la cebada (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* L.; Orabi *et al.*, 2007) y frijol común (*Phaseolus vulgaris*; Chacón *et al.*, 2005). Para el caso particular de la domesticación del frijol Lima, algunos estudios han demostrado la eficacia de usar marcadores provenientes de ADNcp (Motta-Aldana *et al.*, 2010; Serrano-Serrano *et al.*, 2010; Fofana *et al.*, 1999).

Marcadores microsatélites (SSR)

Los marcadores SSR están constituidos por secuencias cortas de ADN de uno a seis pares de bases nucleotídicas repetidas en tándem, que se encuentran esparcidos por todo el genoma (González, 2003); en comparación con otro tipo de marcadores (Cuadro 1) los SSR debido a su naturaleza de locus específico, altos niveles de polimorfismo,

abundancia en el genoma, relativa facilidad con que es registrada su variación y a su modo de herencia codominante, son ampliamente usados y han llegado a ser una herramienta poderosa para estudios ecológicos, evolutivos y de diversidad genética (Orabi *et al.*, 2007; Matus y Hayes, 2002; Olsen y Schaal, 2001; Provan *et al.*, 2001; Powell *et al.*, 1996; Morgante y Olivery, 1993). Diversos estudios han demostrado la utilidad de los marcadores SSR para estudiar la evolución y domesticación de las plantas, como es el caso del frijol común (*P. vulgaris*; Angioi *et al.*, 2011; Kwak *et al.*, 2009), calabaza (*Cucurbita pepo*; Gong *et al.*, 2011), maíz (*Zea mays*; Matsuoka *et al.*, 2002), uva (*Vitis vinifera* subsp. *sativa* L.; Grassi *et al.*, 2003), yuca (*Manihot esculenta* subsp. *esculenta* Crantz.; Olsen y Schaal, 2001) y cebada (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*; Orabi *et al.*, 2007).

Cuadro 1. Comparación de las características que diferencian a los marcadores SSR de otros marcadores moleculares.

Marcador	Número	Codominante	Polimorfismo	Específico de locus	Tecnicidad
SSR	Ilimitado	Sí	Muy alto	Sí	Bajo
Isoenzimas	< 90	Sí	Bajo	Sí	Bajo
RFLP	Ilimitado	Sí	Medio	Sí	Alto
RAPD	Ilimitado	No	Medio	No	Bajo
ISSR	Ilimitado	No	Alto	Sí	Bajo/medio
AFLP	Ilimitado	No	Alto	No	medio

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

La mayoría de los trabajos realizados sobre la domesticación del frijol Lima se han enfocado principalmente en la domesticación del acervo génico andino, siendo menos estudiado la domesticación del acervo génico mesoamericano. Esto, aunado a factores como: a) la falta de material colectado en áreas claves de su rango de distribución natural, b) la gran diversidad de formas domesticadas observadas y, c) la amplia distribución geográfica que presentan tanto las poblaciones silvestres como domesticadas, no han permitido profundizar en el conocimiento sobre la domesticación de este acervo. Considerando esto, en este trabajo se plantearon las siguientes interrogantes:

- ¿Dentro del amplio rango de distribución geográfica abarcado por las poblaciones silvestres y domesticadas del acervo génico mesoamericano del frijol Lima, en que área se localiza su centro de domesticación?
- ¿La domesticación del acervo génico mesoamericano del frijol Lima es resultado de un solo evento de domesticación, o ha sido resultado de eventos múltiples?
- ¿La domesticación del acervo génico mesoamericano ha generado una reducción en la diversidad genética de las poblaciones domesticadas como resultado de un efecto fundador?

HIPÓTESIS

1. Aún cuando las poblaciones silvestres del acervo génico mesoamericano del frijol Lima presentan una amplia distribución geográfica, y tomando en cuenta resultados de trabajos previos mencionados anteriormente (Motta-Aldana *et al.*, 2010; Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995; Kaplan, 1965), el centro de domesticación de éste acervo se ubica en la región del Istmo de Tehuantepec, México.
2. La diferenciación existente entre las formas domesticadas del acervo génico mesoamericano del frijol Lima, es debida a un proceso post-domesticación y no a la existencia de domesticación múltiple.
3. Al igual que en la mayoría de las especies domesticadas estudiadas, durante el proceso de domesticación del acervo génico mesoamericano del frijol Lima se ha presentado una reducción en su diversidad genética como resultado de un efecto fundador ocurrido durante su domesticación.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer los patrones de domesticación de las variedades cultivadas del acervo génico mesoamericano del frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L.) mediante el uso de marcadores moleculares SSR y dos espaciadores intergénicos de ADN de cloroplasto.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el centro de domesticación del acervo génico mesoamericano del frijol Lima.
2. Demostrar si la domesticación de este acervo fue un evento único o múltiple.
3. Aportar evidencias sobre la existencia o ausencia de un efecto fundador durante el proceso de domesticación del acervo en estudio.

EXTRATEGIA EXPERIMENTAL

El análisis molecular se realizó en dos etapas: la primera etapa se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL) con sede en Bogotá, Colombia, bajo la supervisión de la profesora investigadora María Isabel Chacón Sánchez. En esta primera etapa, se incluyeron en el análisis un total de 262 accesiones silvestres y domesticadas. De éstas, 235 pertenecen al acervo génico mesoamericano y 27 al acervo génico andino del frijol Lima. Del total de accesiones, 109 que ya habían sido secuenciadas por Motta-Aldana *et al.* (2010) y Serrano-Serrano *et al.* (2010) fueron obtenidas del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), y 88 fueron obtenidas de otras colecciones de germoplasma mantenidas en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, Cali, Colombia), el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-CEBAJ,

Celaya, México), la universidad de Guadalajara (U. de G, Guadalajara, México) y el Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY, Mérida, México) y 65 accesiones colectadas *in situ*, en la costa del Pacífico de México, el Istmo de Tehuantepec, México, la costa del Golfo de México y el departamento Petén en Guatemala. En esta primera etapa incluimos un pequeño grupo de accesiones del acervo secundario del frijol Lima (*P. augustii*, *P. pachyrrhizoides* y *P. bolivianus*) como grupo externo. Como marcador molecular se usaron dos espaciadores intergénicos del ADN de cloroplasto (*atpB-rbcL* y *trnL-trnF*) que han demostrado su eficacia en estudios de domesticación en frijol común (Chacón *et al.*, 2005) y frijol Lima (Motta-Aldana *et al.*, 2010; Serrano-Serrano *et al.*, 2010). Todas las muestras fueron secuenciadas y analizadas mediante un enfoque filogeográfico.

La segunda etapa se desarrolló en el Laboratorio de Marcadores Moleculares de la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. (CICY). En esta segunda etapa se incluyeron un total de 150 accesiones, silvestres (91) y domesticadas (59) del acervo génico mesoamericano del frijol Lima, las cuales fueron obtenidas a partir de: 1) la colección base mundial del CIAT-Colombia, 2) la colección del Dr. Jorge Acosta (INIFAP-Celaya), 3) la colección del Dr. Rogelio Lépiz (U de G), 4) la colección del Dr. Jaime Martínez (CICY-Mérida), y 5) se realizaron 4 colectas *in situ* en áreas de México y Guatemala, gracias a las cuales se lograron coleccionar un total de 95 accesiones, incluyendo al estudio 65 nuevas accesiones de regiones geográficas que no han sido incluidas en estudios anteriores. Como marcador molecular se usaron 10 loci de microsatélites (SSR- Secuencias Simples Repetidas) de ADN de núcleo. Los datos fueron analizados mediante la aplicación de un enfoque de genética de poblaciones para analizar las relaciones genéticas entre las accesiones silvestres y domesticadas del acervo génico mesoamericano del frijol Lima y así poder discutir las implicaciones sobre su domesticación.

BIBLIOGRAFÍA

Andueza-Noh, R.H., M.L. Serrano-Serrano, M.I. Chacón, I. Sánchez del-Pino, L. Camacho-Pérez, J. Coello-Coello, J.O. Mijangos-Cortés, D.G. Debouck y J.

- Martínez-Castillo (2012). Multiple domestications of the Mesoamerican gene pool of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.): evidence from chloroplast DNA sequences. Genetic Resources and Crop Evolution, DOI, 10.1007/s10722-012-9904-9.
- Angioi, S.A., D. Rau, G. Attene, L. Nanni, E. Belluci, G. Logozzo, V. Negri, P.L. Spagnoletti y R. Papa (2010). Beans in Europe: origin and structure of the European landraces of *Phaseolus vulgaris* L. Theoretical and Applied Genetics, 121, 829-843.
- APG III. (2009). An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants. Botanical Journal of the Linnean Society, 161, 105-121.
- Ballesteros, P.G. (1999). Contribuciones al conocimiento del frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) en América tropical. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. 386 p.
- Ballhorn, J.D., S. Kautz, U. Lion y M. Hell (2008). Trade off between direct and indirect defences of Lima bean (*Phaseolus lunatus*). Journal of Ecology, 96, 971-980.
- Baudoin, J.P., O. Rocha, J. Degreef, A. Maquet y L. Guarino (2004). Ecogeography, Demography, Diversity and Conservation of *Phaseolus lunatus* L. in the Central Valley of Costa Rica. Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genepools. Internacional Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 94 p.
- Baudoin, J.P. (1991). La Culture et l'Amélioration de la Légumineuse Alimentaire *Phaseolus lunatus* L. en Zones Tropicales. Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale, Ede, Pays-Bas / Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux, Belgique. 209 p.
- Baudoin, J. (1988). Genetic resources domestication and evolution of Lima beans, *Phaseolus lunatus*. in: Genetic Resources of *Phaseolus* Beans, Gepts P. (Ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrech, Holland. pp. 393-407
- Baudet, J.C. (1977). The taxonomic status of the cultivated types of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). Tropical Grain Legume Bulletin, 7, 29-30.
- Buckler, E.S., N.M. Goodman, T.P. Holstford, J.F. Doebley y J. Sánchez (2006). Phylogeography of the wild subspecies of *Zea mays*. Maydica, 51, 123-134.
- Casas, A., A. A. Otero, E.N. Pérez y A. Valiente-Banuet (2007). "In situ management and domestication of plants in Mesoamerica". Annals of Botany, 100, 1101-1115.
- Chacón, S.M.I. (2009). Darwin y la domesticación de plantas en las Américas: el caso del maíz y el frijol. Acta Biológica Colombiana, 14, 351-364.

- Chacón, M.I., S.B. Pickersgill y D.G. Debouck (2005). Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. *Theoretical and Applied Genetics*, 110, 432-444.
- Debouck D.G. (2008). Notes sur les différents taxons de *Phaseolus* à partir des Herbiers-Section Paniculati, 233 pp. Available from: <http://www.ciat.cgiar.org/urg>. [Acceso 22 de mayo 2011].
- Debouck, D., J.H.L. Jara, A.C. Sierra, y J.H.d.I.C. Rojas (1987). Observations on the domestication of *Phaseolus lunatus* L. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 70, 26-32.
- Debouck, D.G. (1986). Primary diversification of *Phaseolus* in the Americas: three centres? *FAO/ IBPGR Plant Genetic Resources Newsletter*, 67, 2-8.
- Diamond, J. (2002). Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*, 418, 700-707.
- Diamond, J. (1997). *Guns, Germs and Steel: The Fates of Humans Societies*. N.W. Norton, New York, USA. 480 p.
- Dixon, E.J. (2001). "Human colonization of the Americas: timing, technology and process". *Quaternary Science Reviews*, 20, 277-299.
- Doebley, J.F., B.S. Gaut y B.D. Smith (2006). The molecular genetics of crop domestication. *Cell*, 127, 1309-1321.
- Doebley, J. (1984). Maize introgression into teosinte a reappraisal. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 71, 1100-1113.
- Esquivel, M., L. Castiñeira, y K. Hammer (1993). The domestication of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Cuba: morphological and biochemical studies. *FAO/IPGRI. Plant Genetic Resources*, 92, 21-22.
- Fofana, B., P. du Jardin y J.P. Baudoin (2001). Genetic diversity in the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by chloroplast DNA (cpDNA) variations. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48, 437-445.
- Fofana, B., J.P. Baudoin, X. Vekemans, D.G. Debouck y P. du Jardin (1999). Molecular evidence for an Andean origin and a secondary gene pool for the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) using chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 202-212.
- Fofana, B., X. Vekemans, E. du Jardin y J.P. Baudoin (1997). Genetic diversity in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by RAPD markers. *Euphytica*, 95, 157-165.

- Fukunaga, K., J. Hill, Y. Vigouroux, Y. Matsuoka, G.J. Sánchez, K. Liu, E.S. Buckler y F. Doebley (2005). Genetic diversity and population structure of teocintle. *Genetics*, 169, 2241-2254.
- Freeland, J.R. (2005). *Molecular Ecology*. John Wiley and Sons Ltd. London, England. 388 p.
- Fuller, Q.D. (2007). Contrasting patterns in crop domestication and domestication rates: recent archaeobotanical insights from the Old World. *Annals of Botany*, 100, 903-924.
- Gepts, P. (2004). Crop Domestication as a Long-term Selection Experimental. *Plant Breeding Reviews*, 24, 44 p.
- Gepts, P. (1988). Phaseolin as an evolutionary marker, in: *Genetic Resources of Phaseolus Beans*. Gepts P. (ed.). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Holland. pp. 215-241.
- González, E.G. (2003). Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59, 377-388.
- Gutiérrez-Salgado, A., P. Gepts y D.G. Debouck (1995). Evidence for two gene pools of the Lima beans, *Phaseolus lunatus* L., in the Americas. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 42, 15-28.
- Grassi, F., M. Labra, S. Imazio, A. Spada, S. Sgorbati, A. Scienza y F. Sala (2003). Evidence of a secondary grain domestication centre detected by SSR analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 1315-1320.
- Hammer, K. (1984). Das domestikations syndrom. *Kulturpflanze*, 32, 11-34.
- Harlan, J.R. (1992). *Crops and Man*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA. 284 p.
- IPGRI, (2003). *Tecnología de Marcadores Moleculares para Estudios de Diversidad Genética de Plantas*. Cornell University, Roma, Italia. 56 p.
- Jaenicke, D.V. y B.D. Smith (2006). Ancient ADN and integration of archaeological and genetic approaches to study of maize domestication. in: *Histories of Maize*. Staller J, Tykot R y Benz B (eds.). Academic Press, San Diego, USA. pp 83-95.
- Kaplan, L. y T.F. Lynch (1999). *Phaseolus* (Fabaceae) in archaeology: AMS radiocarbon dates and their significance for pre-colombian agriculture. *Economic Botany*, 53, 261-272.

- Kaplan, L. y L.N. Kaplan (1988). *Phaseolus* in archaeology. In: Genetic Resources of *Phaseolus* Bean, Gepts P. (Ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holland. pp. 125-142
- Kaplan, L. (1965). Archaeology and domestication in American *Phaseolus* (beans). *Economic Botany*, 19, 358-368.
- Karp, A. y K. Edwards (1997). DNA Markers: A Global Overview. In: DNA Markers Protocols, Application, and Overviews Caetano-Anollés G. (Ed.) Wiley, USA. p. 1-13.
- Kress, W.J., K.J. Wurdack, E.A. Zimmer, L.A. Weigt y D.H. Janzen (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of science, USA*, 102, 8369-8374.
- Kwak, M., J. Kami y P. Gepts (2009). The putative Mesoamerican center of domestication of *Phaseolus vulgaris* L. is located in the rio Lerma-Santiago basin of Mexico. *Crop Science*, 49, 554-563.
- Ladizinsky, G. (1985). Founder effect in crop-plant evolution. *Economic Botany*, 39, 191-199.
- Lioi, L. y I. Galazo (2002). Oligonucleotide DNA fingerprinting revealing polymorphism in *Phaseolus lunatus* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49, 53-58.
- Lioi, L., F. Sparvoli y 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 y I. Galasso (1998). Isozyme diversity, RFLP of the rDNA and phylogenetic affinities among cultivated Lima beans, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae). *Plant Systematic and Evolution*, 213, 153-164.
- Lioi, L. (1996). Phaseolin diversity in wild Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in American centres of origin. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 43, 575-580.
- López-Soto, J.L., C.J.A. Ruiz, G.J.J. Sánchez y I.R. Lépiz (2005). Climatic adaptation of 25 wild bean species (*Phaseolus* spp) in Mexico. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28, 221-230.
- Makie, W.W. (1943). Origin, dispersal and variability of the lima bean, *Phaseolus lunatus* L. *Hilgardia*, 15, 1-29.
- Maquet, A., X. Vekemans, y J.P. Baudoin (1999). Phylogenetic study on wild allies of Lima bean, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae) and implications on its origin. *Plant Systematic and Evolution*, 218, 43-54.

- Maquet, A., I. Zoro Bi, M. Delvaux, B. Wathelet y J.P. Baudoin (1997). Genetic structure of a Lima bean base collection using allozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 980-991.
- Maquet, A., y J.P. Baudoin (1997). Aperçu de la distribution néotropicale de *Phaseolus lunatus*. (A survey of the neotropical distribution of *Phaseolus lunatus*). *Belgian Journal of Botany*, 130, 93-116.
- Maquet, A. (1995). Étude de la Diversité Génétique de la Légumineuse Alimentaire *Phaseolus lunatus* L. par l'Analyse de Caracteres Morphophysiologiques et 74 de Marqueurs Protéiques. Tesis de Doctorado, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, Gembloux, Belgique. 203 p.
- Martínez-Castillo, J., L. Camacho-Pérez, J. Coello-Coello y R.H. Andueza-Noh (2011). 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., D. Zizumbo-Villarreal, P. Gepts, P. Delgado-Valerio y P. Colunga-García-Marín (2006). Structure and genetic diversity of wild populations of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Yucatan peninsula, Mexico. *Crop Science*, 46, 1071-1080.
- Martínez-Castillo, J. (2005). Diversidad intraespecífica de *Phaseolus lunatus* L. e intensificación de la agricultura tradicional en la Península de Yucatán, México. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México 120 p.
- Martínez-Castillo, J., D. Zizumbo-Villarreal, H. Perales-Rivera y P. Colunga-García-Marín (2004). Intraspecific diversity and morpho-phenological variation in *Phaseolus lunatus* L. from the Yucatan peninsula, Mexico. *Economic Botany*, 58, 354-380.
- Matsuoka, Y., Y. Vigouroux, M.M. Goodman, G.J. Sanchez, E. Buckler y J. Doebley (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99, 6080-6084.
- Matus, I.A. y P.M. Hayes (2002). Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. *Genome*, 45, 1095-1106.
- Metcalfe, S. E. (2006). "Late quaternary environments of the northern deserts and central transvolcanic belt of Mexico". *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 93, 258-273.

- Miller, A. y B. Schaal (2005). Domestication of a Mesoamerican cultivated fruit tree, *Spondias purpurea*. Proceedings of the National Academic Sciences USA, 36, 12801-12806.
- Morgante, M., y A.M. Olivieri (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. The Plant Journal, 3, 175-182.
- Motta-Aldana, J., M.L. Serrano-Serrano, H.J. Torres, C.G. Villamizar, D.G. Debouck y M.I. Chacón (2010). Multiple origins of Lima bean landraces in the Americas: evidence from chloroplast and nuclear DNA polymorphisms. Crop science, 50, 1773-1787.
- Olsen, K.M. y B.A. Schaal (2001). Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: further evidence for a southern Amazonian origin of domestication. American Journal of Botany, 88, 131-142.
- Olsen, K.M. y B.A. Schaal (1999). Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 96, 5586-5591.
- Orabi, J., G. Backes, A. Wolday, A. Yahyaoui y A. Jahoor (2007). The horn of Africa as a centre of barley diversification and a potential domestication site. Theoretical and Applied Genetics, 114, 1117-1127.
- Perry, L., y K.V. Flannery (2007). Precolumbian use of chilli peppers in the Valley of Oaxaca, Mexico. Proceedings of the National Academic of Sciences USA, 104, 11905-11909.
- Perry, A.S. y K.H. Wolfe (2002). Nucleotide substitution rates in legume chloroplast DNA depend on the presence of the inverted repeat. Journal of Molecular Evolution, 55, 501-508.
- Powell, W., G.C. Machray y J. Provan (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in Plant Science, 1, 215-222.
- Pickersgill, B. (2007). Domestication of plants in the Americas: Insights from mendelian and molecular genetics. Annals of Botany, 100, 925-940.
- Piperno, D.R., J.E. Moreno, J. Iriarte, I. Holst, M. Lachniet, G. Jones, A.J. Ranere, y R. Castazo (2007). Late Pleistocene and Holocene environmental history of the Iguala Valley, central balsas watershed of Mexico. Proceedings of the National Academic of Sciences USA, 104, 11874-11881.
- Poinar, H.K., M. Kuch, D.K. Sobolik, I. Barnes, A.B. Stankiewicz, T. Kuder, W.G. Spaulding, V.M. Bryant, A. Cooper y S. Paabo (2001). A molecular analysis of

- dietary diversity for three archaic Native Americans. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA*, 98, 4317-4322.
- Provan, J., W. Powell y P.M. Hollingsworth (2001). Chloroplast microsatellites: New tools for studies in plant ecology and evolution, *Trends in Ecology and Evolution*, 16, 142-174
- Sanjur, O.I., D.R. Piperno, T.C. Andrés y W.B. 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. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA*, 99, 535-540.
- Serrano-Serrano, M.L., R.H. Andueza-Noh, J. Martínez-Castillo, D.G. Debouck, y M.I. Chacón (2012). Evolution and domestication of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Mexico: Evidence from ribosomal DNA. *Crop Science*, 52, 1698-1712.
- Serrano-Serrano, M.L., J. Hernandez-Torres, G. Castillo-Villamizar, D.G. Debouck y M.I. Chacón (2010). Gene pools in wild Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Americas: Evidences for an Andean origin and past migrations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54, 76-87.
- Shaw, J., B.E. Lickey, E.E. Schilling y L.R. Small (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94, 275-288.
- Smartt, J. (1988). Morphological, physiological and biochemical changes in *Phaseolus* beans under domestication. in: *Genetic Resources of Phaseolus Beans*. Gepts P. (Ed.). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Holland. pp. 143-161.
- Smith, B.D. (1997). The initial domestication of *Cucurbita pepo* in the Americas 10,000 years ago. *Science*, 276, 932-934.
- Smith, B.D. (1989). Origins of agriculture in eastern North America. *Science*, 246, 1566-1571.
- Soltis, D.E., y P.S. Soltis (1998). Choosing an approach and appropriate gene for phylogenetic analysis. in: *Molecular Systematic of Plants II DNA Sequencing*, Soltis D.E, Soltis P.S. y Doyle J.J. (eds). Kluwer Academic Publishers. Boston, USA. pp. 1-42.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou, y J. Bouvet (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105-1109.

- Willis, W.H. (1995). Archaic foraging and the beginning of food production in the American Southwest. in: Last Hunters, First Farmers, Price T.D., Gebauer A.B. (eds). School of American Research, Santa Fe, California, USA. pp 215-242.
- Zeder, M.A., D.G. Bradley, E. Emshwiler y B.D. Smith (2006). Documenting Domestication. New Genetic and Archaeological Paradigms. University of California, London, England. 361 p.
- Zizumbo-Villarreal, D. y P. Colunga-García Marín (2010). Origin of agriculture and plant domestication in west Mesoamerica. Genetic Resources and Crop Evolution, 57, 813-825.
- Zizumbo-Villarreal, D. y P. Colunga-García Marín (2008). El Origen de la agricultura, la domesticación de plantas y el establecimiento de corredores biológico-culturales en Mesoamérica. Geografía Agrícola, 41, 85-113.
- Zohary, D. (1999). Monophyletic vs polyphyletic origin of the crops on which agricultura was founded in the Near East. Genetic Resources and Crop Evolution, 46, 133-142.

MULTIPLE DOMESTICATIONS OF THE MESOAMERICAN GENE POOL OF LIMA BEAN (*Phaseolus lunatus* L.): EVIDENCE FROM CHLOROPLAST DNA SEQUENCES¹

ABSTRACT

The Mesoamerican (MA) gene pool of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is widely distributed from northern Mexico to northern Argentina in its wild forms and from the southern United States to the east coast of Brazil in its domesticated forms. This broad distribution and lack of wild accessions of the MA gene pool in many areas of its natural distribution has impeded determining its center of domestication and establishing whether it has a single or multiple centers. To answer these questions, we evaluated 262 accessions of *P. lunatus* using two intergenic spacers of chloroplast DNA: *atpB-rbcL* and *trnL-trnF*. The data were analyzed using a maximum likelihood tree (ML), a haplotype network and two estimators of genetic differentiation (N_{ST} and G_{ST}). Nucleotide diversity (π) and haplotype diversity (H_d) were quantified to estimate the percentage of reduction in genetic diversity (%r) as a founder effect. The ML tree and haplotype network indicated the existence of three groups (AI, MI and MII), which were supported by the high values of N_{ST} (0.61 to 0.80). Values for %r were high (58.67-60.83%). Existence of Mesoamerican and Andean gene pools was confirmed, with two genetically and geographically distinct groups (MI and MII) within the MA gene pool. We present the first evidence for multiple origins of domestication for the MA gene pool. For MI, we propose western central Mexico as the domestication area and an area between Guatemala and Costa Rica for MII. We observed a founder effect in the MA gene pool as a result of domestication.

Keywords: domestication, founder effect, Lima bean, Mesoamerican gene pool

¹Andueza-Noh, R.H., M.L. Serrano-Serrano, M.I. Chácon Sánchez, I. Sánchez del Pino, L. Camacho-Pérez, J. Coello-Coello, J. Mijangos Cortes, D.G. Debouck, y J. Martínez-Castillo. Multiple domestications of the Mesoamerican gene pool of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.): evidence from chloroplast DNA sequences. Genetic Resources and Crop Evolution. Publicado en línea.

INTRODUCTION

Plant domestication is an evolutionary process that operates under the influence of man (Harlan 1992; Gepts 2004; Zeder et al. 2006). Through this process, landraces emerge from their wild progenitors, so that the wild species are the genetic base of the landraces, and the landraces are the genetic base of our modern crops (Harlan 1992; Zohary 1999; Gepts 2004). During their domestication, plants acquire a set of morphological and physiological traits that differentiate them from their wild progenitors, a process called the domestication syndrome (Harlan 1992; Doebley et al. 2006). This process includes, among other aspects, the loss of seed dispersal, loss of seed dormancy, development of photoperiod insensitivity, and an increase in fruit size (Hammer 1984; Fuller 2007; Pickersgill 2007). Fundamental goals to elucidate the origin and domestication of plants are (1) identifying the wild ancestors of domesticated plants, (2) documenting the geographic location of wild relatives that gave rise to the domesticated, and (3) determining the number of times and the regions of domestication for that crop (Zeder et al. 2006). Another important issue is to understand the impact of the domestication on the genetic diversity of modern crops, known as the founder effect (Ladizinsky 1985, 1998).

New tools and techniques such as scanning electron microscopy of starch grains, pollen or phytoliths (Perry and Flannery 2007; Piperno et al. 2007, 2009) and continually improving molecular techniques have expanded our understanding of plant domestication (Doebley et al. 2006; Zeder et al. 2006; Pickersgill 2007). Currently, molecular markers generated from sequence variations in the chloroplast genome (cpDNA) are among the most frequently used to understand the phylogenetic, population dynamics, evolution and domestication of plants (Taberlet et al. 1991; Kress et al. 2005; Zeder et al. 2006). These markers offer several advantages as compared with nuclear DNA markers because cpDNA markers are maternally inherited in most plants and mutation rate is much lower than nuclear DNA markers (Holwerda et al. 1986). The cpDNA markers are thus ideal for tracing maternal ancestry and for evolutionary and taxonomic studies (Vanichanon et al. 2003). Among the main noncoding cpDNA regions that have been used in phylogenetic, phylogeographic and domestication studies are the introns *rpl16*, *ndhA*, *3'trnK-matK*, *trnL*

and the intergenic spacers *trnT-trnL*, *trnG-trnS*, *atpB-rbcL* and *trnL-trnF* among others (Taberlet et al. 1991; Shaw et al. 2005, 2007).

The study of plant domestication has shown that some crops have been derived from a single domestication. Some examples include maize (*Zea mays* L.) (Matsuoka et al. 2002; Buckler et al. 2006) and cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) (Olsen and Schaal 1999, 2001). Crops that have been domesticated from multiple domestication events in time and/or space include wheat (*Triticum aestivum* L.) (Orabi et al. 2007), rice (*Oryza sativa* L.) (Tang and Shi 2007), pumpkins (*Cucurbita* spp.) (Andrés 1990; Sanjur et al. 2002); chilies (*Capsicum* spp.) (Pickersgill 1989; Aguilar-Meléndez et al. 2009) and beans (*Phaseolus* spp.) (Gepts 1990). In addition, multiple domestication events in different populations of the same species have also been reported but are rare; two of the best known are common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) (Gepts and Debouck 1991; Chacón et al. 2005) and Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) (Gutiérrez-Salgado et al. 1995; Motta-Aldana et al. 2010).

Lima bean, one of the five domesticated species of *Phaseolus* (Fabaceae), is the second most important food species in this genus, only after the common bean (Baudoin et al. 2004). It originated in America and has evolved in the New World tropics over 10,000 years (Kaplan and Lynch 1999). Morphological (Debouck et al. 1987), biochemical (Gutiérrez-Salgado et al. 1995; Lioi et al. 1999; Lioi and Galazo 2002), paleobotanic (Kaplan 1965; Kaplan and Lynch 1999) and molecular evidence (Caicedo et al. 1999; Fofana et al. 2001; Motta-Aldana et al. 2010) indicates the existence of two major gene pools both containing wild (*P. lunatus* var. *silvester*) and cultivated (*P. lunatus* var. *lunatus*) forms: an Andean gene pool (AG), represented by the big lima cultigroup, and a Mesoamerican (MA) gene pool, represented by the sieva and potato cultigroups. Recent studies have identified two groups that have genetically differentiated within the MA gene pool and have well-defined geographical areas: the MI group in the western and northwestern part of the Isthmus of Tehuantepec in Mexico and the MII group in the eastern and southeastern area of the Isthmus of Tehuantepec, Central America (Guatemala, El Salvador, Honduras and Costa Rica), the Caribbean (Cuba) and South America (Colombia, southern Peru and Argentina) (Motta-Aldana et al. 2010; Serrano-Serrano et al. 2010).

Studies on the domestication of lima bean have uncovered two temporally and spatially separated domestication events that involve the AG and MA gene pools. The domestication area of AG has been located in western valleys at middle elevation between Ecuador and northern Peru, a single region with wild populations of this gene pool (Debouck et al., 1987; Gutiérrez-Salgado et al. 1995; Caicedo et al. 1999; Maquet et al. 1999; Motta-Aldana et al. 2010). The MA gene pool is considered to have been domesticated in Mesoamerica; however, the wild forms are distributed from Mexico to Argentina, and the cultivated forms are distributed from the southwestern United States to the eastern coast of Brazil (Debouck et al. 1987; Gutiérrez-Salgado et al. 1995; Motta-Aldana et al. 2010). This broad distribution and the lack of wild samples collected in several areas of natural distribution have so far confounded the discovery of the domestication center of this gene pool. Biochemical (Gutiérrez-Salgado et al. 1995; Lioi 1996; Maquet et al. 1997) and molecular (Fofana et al. 2001; Motta-Aldana et al. 2010) evidences have indicated that the center of domestication may lie within Mexico (specifically in the northern and northwestern part of the Isthmus of Tehuantepec) to northern Guatemala. The great genetic and morphological diversity found in landraces of the MA gene pool in the Yucatan Peninsula has also been used as evidence to suggest this region as the likely area of domestication for the MA gene pool (Ballesteros 1999; Martínez-Castillo et al. 2004), but recently, Serrano-Serrano et al. (2012), using an ITS region of nuclear DNA, suggested that western central Mexico may be the center of domestication of the MA gene pool (MI).

Considering the information gaps about Lima bean domestication in Mesoamerica, we incorporated new wild populations collected in 2009 and 2010 throughout their natural range geographical distribution in Mexico and Guatemala in efforts to (1) find the center of domestication of the MA gene pool of Lima bean, (2) determine whether the domestication of MA gene pool was a single or multiple event, and (3) provide evidence of a founder effect in this species. Two intergenic spacers of cpDNA were used: *atpB-rbcL* and *trnL-trnF*.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The samples included a total of 262 wild and domesticated accessions, 235 accessions were from the MA gene pool and 27 from AG. The selection of plant material was made base on reports by Maquet and Baudoin (1997) who conducted a study to determine the geographical distribution of Lima beans, inspecting botanical monographs, regional floras, collections data, herbarium specimens and germplasm bank data and recent information on the distribution of Lima bean by Debouck (2011). Those suggest that our sampling of Lima bean may be close to complete. Of these accessions, 109 were sequenced by Serrano-Serrano et al. (2010) and Motta-Aldana et al. (2010) and obtained from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>); 88 were obtained from other germplasm collection held at: International Center for Tropical Agriculture (CIAT, Cali, Colombia), Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-CEBAJ, Celaya, Mexico), Universidad de Guadalajara (U. de G, Guadalajara, Mexico) and Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY, Mérida, Mexico); and 65 accessions were collected *in situ*, throughout the Pacific coast of Mexico, Isthmus of Tehuantepec, Gulf of Mexico and the department of Peten Guatemala between January and February of 2009 and 2010. These 65 are wild accessions that had not been collected or analyzed previously. As an outgroup, we included a small group of accessions from a secondary gene pool of lima bean (*P. augusti*, *P. pachyrrhizoides* and *P. bolivianus*). The geographical distribution and complete voucher data of the accessions can be seen in supplementary material S1.

DNA extraction and amplification

Ten seeds of each accession were germinated in a greenhouse at the Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY, Mérida, Yucatán, Mexico). Genomic DNA was extracted from young leaves using the CTAB method (Doyle and Doyle 1987). PCR amplifications were performed in a total volume of 30 µl each reaction containing: buffer *Taq* 1×, MgCl₂ 2.0 mM, dNTPs 0.2 µM, 0.5 µM of each primer and 1 U de *Taq* DNA polymerase. The sequencing cycles were run in a Biorad thermocycler. For amplification of the intergenic spacer *atpB-rbcL* and *trnL-trnF*, we used published primers of Chiang et al. (1998) and Taberlet et al. (1991) and the temperature profiles consisting of one cycle of 4

min at 94°C; 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 50.0°C, 2 min at 72°C, and a final extension at 72 °C for 10 min, PCR products were visualized using EZ-Vision (Amresco, Solon-USA) by agarose gel electrophoresis.

DNA sequencing

PCR fragments were purified using the Kit Wizard SV Gel and the PCR clean-up system from Promega (Madison, WI, USA) and sequenced by Macrogen in an ABI 3700 (<http://www.macrogen.com>). The obtained sequences were edited with the program BioEdit version 5.0.6 (Hall 1999) and aligned using Muscle version 3.6 (Edgar 2004). Gaps were coded according to the method proposed by Simmons and Ochoterena (2000).

Data analyses

Relationships, genetic structure and domestication of lima bean

To determine where and how many times the MA gene pool of Lima bean has been domesticated, we established genetic relationships among the accessions by constructing a maximum likelihood tree (ML) and haplotype network. For the ML tree, the model of nucleotide substitution that best fit to the data set was calculated using the programs PAUP* (Swofford 1998) and ModelTest (Posada and Crandall 2001a) and selected using the Akaike information criterion (AIC). Cluster support was then assessed by means of 1,000 bootstrap replicates with the program MEGA 5 (Tamura et al. 2011). The haplotype network was built using a 95% parsimony criterion (Templeton et al. 1987) using TCS program version 2.1 (Clement et al. 2000).

To support the results generated with the ML tree and haplotype network, we evaluated the genetic structure at the group level using two estimators (N_{ST} and G_{ST}). For DNA sequence data, N_{ST} is commonly used. This estimator is analogous to F_{ST} , which takes into account the average number of differences between pairs of sequences, either of the same or of different subpopulations (Lynch and Crease 1990). Another estimator used to evaluate genetic structure, G_{ST} , was developed for use with multiple loci (Nei 1973). In this way, G_{ST} allows to compare the results obtained in this study with results generated from previous studies using other molecular markers. Estimators of genetic differentiation were obtained using the DNAsp program (Rozas et al. 2003). Finally, to

determine the variability of the markers used, the two genomic regions were characterized statistically with the program SEQSTATE (Müller 2005).

Genetic diversity and founder effect in lima bean

Genetic diversity, described as the number of segregating sites (S), was quantified as the nucleotide diversity π (Nei 1987; Nei and Miller 1990) and haplotype diversity H_d (Nei 1987). These indices were assessed at total level and level of the groups found.

To evaluate the founder effect in the MA gene pool of Lima bean as a result of domestication, we compared the total genetic diversity of wild accessions with respect to the diversity of domesticated accessions. For this purpose, the percentage of reduction in genetic diversity ($\%r$) was calculated as $\%r = (H_w - H_d)/H_w$, where H_w is the genetic diversity in wild Lima bean and H_d is genetic diversity in domesticated lima bean. This comparison was made at the species level (involving all accessions) and the group level.

RESULTS

*Sequence analysis of chloroplast spacers *trnL-trnF* and *atpB-rbcL**

The two regions of cpDNA provided 1001 characters (324 with *trnL-trnF* and 677 with *atpB-rbcL*). The number of base pairs (bp) of the *trnL-trnF* region, varied from 295 to 323 bp, with 6 indels (transitions/transversions; 2.4% ti/tv), 220 variable sites and 220 informative sites (68%), and 25% GC content. For the *atpB-rbcL* region, variation ranged between 664 and 672 bp, with 74 indels (11% ti/tv), 555 variable sites (28%) and 121 informative sites (18%), and 28% GC content.

Chloroplast haplotypes in wild and domesticated lima beans

Of 40 haplotypes identified in the 262 accessions studied, 32 were identified in wild accessions (Table 2) and 11 in domesticated accessions (Table 3). Of all the haplotypes identified, 38 were restricted geographically. Of the haplotypes in the wild accessions, haplotypes G, T and H were the most frequent. The T haplotype was the most widely distributed in Mesoamerica and South America (Table 2). For the domesticated accessions, haplotypes G and Y were the most frequent. Haplotype G was the most widely

distributed in Mesoamerica and South America (Table 3). Eight unique haplotypes were observed in domesticated accessions (J1, A1, B1, E1, V, I1, X and Y; Table 3).

Table 2. Geographic distribution of cpDNA haplotypes observed in wild accessions of Lima bean.

Collection area	Haplotypes in group MI															Haplotypes in group MII															Haplotypes in group AI		
	Q*	F	J	DI	MI	GI	D	W	FI	PI	KI	H*	HI	WI	E	LI	T*	S	U	K	L	M	QI	TI	NI	P	PI	N	R	A	B	C*	
Mexico	42	1	5	1	1	1	3	1	1		1	14	1		1	1	12						1										
Belize																	1																
Cuba																								1									
Jamaica																																	
Guatemala	3									1		1					17						1			2							
Honduras	1																4									1		1					
El Salvador																	1																
Costa Rica																	6	1										1					
Panama																																	
Venezuela																																	
Colombia	1													1			4	1						1									
Ecuador																													1	1		6	
Peru																					1											2	
Argentina																			2		1												
Brazil										1																							
Total	47	1	5	1	1	1	3	1	1	2	2	15	1	2	1	1	45	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	8	

* Most frequent and widely distributed haplotype in the group. Numbers indicate the number of accessions with a haplotype in the collection region.

Organization of genetic diversity of *P. lunatus* in its natural range

The nucleotide substitution model that best fit the cpDNA data was the general time reversible model with a percentage of invariable sites $I = 0.8785$ and rate of variation among sites of $G = 0.3292$ (GTR + I + G).

The maximum likelihood tree obtained is shown in Fig. 5. Three main groups were recognized AI, MI and MII, using the nomenclature proposed by Serrano-Serrano et al. (2010). The AI group corresponds to the wild and domesticated accessions of AG. The MI and MII groups correspond to the wild and domesticated accessions of the MA gene pool. The AI group is distributed exclusively in South America, mainly between Ecuador and Peru, although it is also seen less frequently in Colombia, Bolivia and Argentina (Figs. 5b and 6), at altitudes from 6 to 2,620 meters above sea level (masl). In particular for the MA gene pool, the MI group (Fig. 5a) consisted of 85 domesticated and 80 wild accessions. The domesticated accessions were distributed widely (Fig. 6, Table 3) throughout Mexico, Guatemala, El Salvador, Cuba, Jamaica, Costa Rica, Honduras, Panama, Venezuela, Colombia, Ecuador, Peru, Argentina and Brazil. On the other hand, most of the wild accessions in MI were restricted to western Mexico, mainly in the coastal states of Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, and Oaxaca. MI accessions were located at altitudes from sea level to 1,740 masl and associated with tropical deciduous forests. The MII group comprised mainly wild accessions (57) and only nine domesticated accessions (Fig. 5b). MII had a smaller geographical distribution than MI and included wild accessions in southern Mexico, mainly in the central area of Oaxaca state, southern Veracruz state and in Tabasco and Chiapas states, extending toward Central America with very low frequency in Colombia, southern Peru and northern Argentina (Fig. 6). In particular, domesticated accessions of MII were only located in Costa Rica, Guatemala, Honduras and Colombia (Table 3). MII is mainly distributed at altitudes from 3 to 1,740 masl, and its location is associated, like MI, to areas of tropical deciduous and semideciduous forests.

Table 3. Geographic distribution of cpDNA haplotypes observed in domesticated accessions of Lima bean. MI, MII and AI groups are defined according to Serrano-Serrano et al. (2010).

Collection area	Haplotypes in MI						Haplotypes in MII			Haplotypes in AI	
	G*	J1	A1	B1	H	E1	T*	V	I1	X	Y*
Mexico	20				4						
Belize											
Cuba	3										
Jamaica	1			1							
Guatemala	10				5	1	1				
Honduras			1				1				
El Salvador	5										
Costa Rica	4						5	1			
Panama	2										
Venezuela	1										
Colombia	11								1		3
Ecuador	1										4
Peru	3									1	4
Bolivia											4
Argentina	3										1
Brazil	5	1									
Total	69	1	1	1	9	1	7	1	1	1	16

*Most frequent and widely distributed haplotype in the group. Numbers indicate the number of accessions with a haplotype in the collection region.

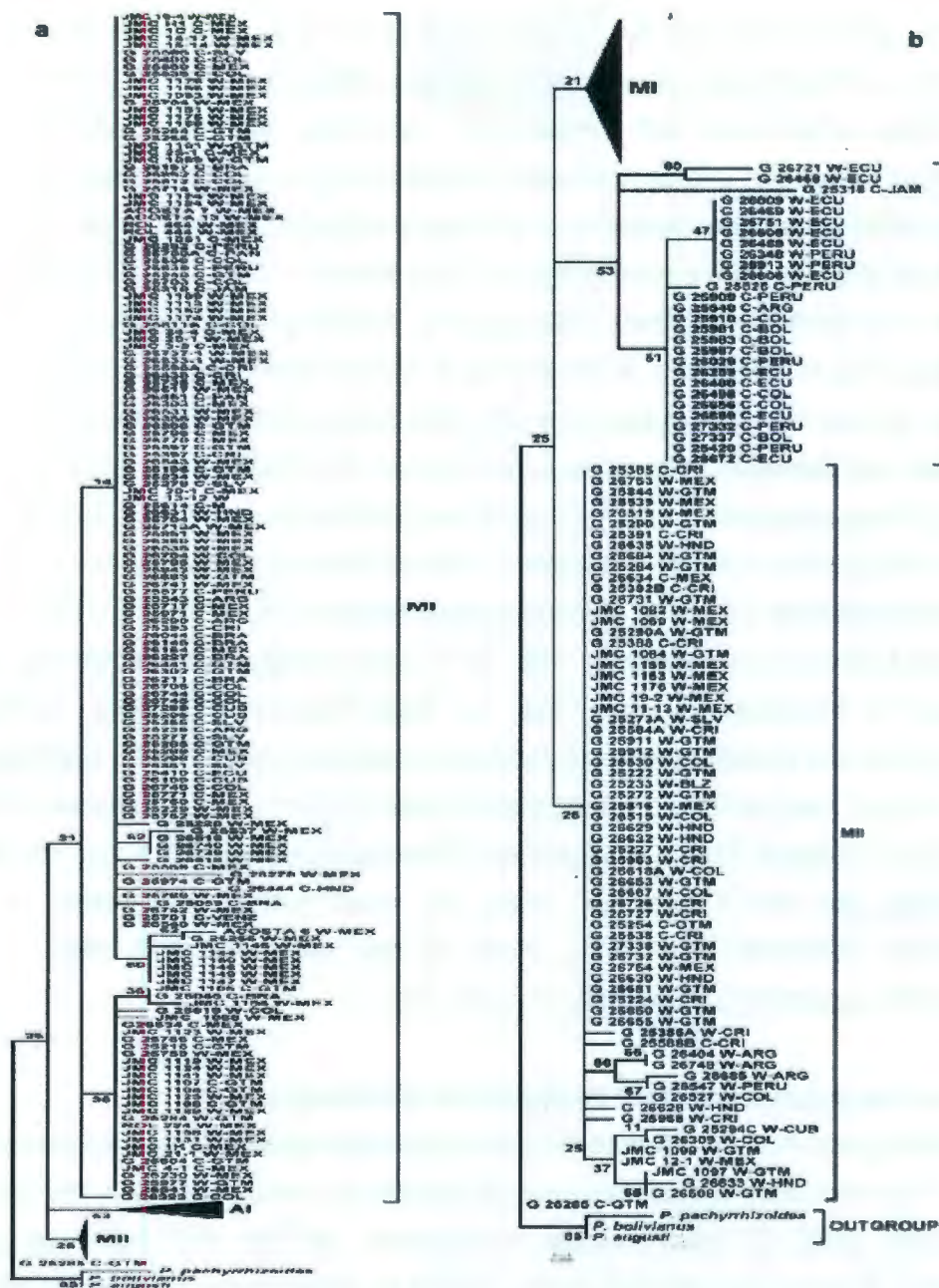


Figure 5. Tree obtained with the maximum likelihood method using 262 accessions of *Phaseolus lunatus* L., and two cpDNA spacers *trnL-trnF* and *aptB-rbcL*. (a) MI group, (b) AI and MII groups. MI and MII = groups of Mesoamerican gene pool, AI = Andean gene pool. Labels indicate the country or region of origin (MEX, Mexico; GTM, Guatemala; BLZ, Belize; CUB, Cuba; JAM, Jamaica; SLV, El Salvador; HND, Honduras; CRI, Costa Rica; PAN, Panama; VENZ, Venezuela; COL, Colombia; BOL, Bolivia; ECU, Ecuador; ARG, Argentina; PERU, Peru; BRA, Brazil). Labels C and W indicate domesticated and wild accessions, respectively

In the haplotype network in Fig. 7, we can see a grouping similar to that observed in the ML tree (Fig. 5), with three major groups that correspond to AI, MI and MII. Group AI corresponds to the wild and domesticated accessions of AG. Groups MI and MII correspond to the wild and domesticated accessions belonging to the MA gene pool. AI had five haplotypes, three belonged to the wild accessions and two to the domesticated accessions (Fig. 7). These haplotypes were distributed in South America, mainly in the area between Ecuador and Peru. Particularly for the MA gene pool, MI had a total of 20 haplotypes (Fig. 7). We found 16 haplotypes in wild accessions, two of which were most common (G and H); G haplotype was the most widely distributed (Mexico, Guatemala, Honduras and Colombia). The 14 less-frequent wild haplotypes were restricted mostly to Mexico. In domesticated accessions from MI, six haplotypes were found; haplotype G was the most frequent and widely distributed in Mesoamerica and South America. Within MI, four haplotypes were unique to domesticated accessions (J1, A1, B1, E1; Fig. 7). On the other hand, MII had 15 haplotypes (Fig. 7); 13 were found in wild accessions, with the exception of haplotype T, which was the most frequent and widely distributed in Mesoamerica and Central America (extending to Colombia). All remaining haplotypes were geographically restricted to a different, specific area (Mexico, Cuba, Guatemala, Honduras, Costa Rica, Colombia, Peru and Argentina). Three haplotypes were found in domesticated accessions, with the T haplotype being the most frequent and widely distributed (Guatemala, Honduras and Costa Rica). In MII, two haplotypes were unique to domesticated accessions (haplotypes V and I1, Fig. 7).

Ancestral haplotypes and their geographical distribution

The coalescence theory predicts that the ancestral haplotypes within a haplotypes network will be those that are (1) most frequent, (2) occupy an interior position in the network (in the central part), (3) have multiple connections, and (4) the largest geographical distribution (Posada and Crandall 2001b). Based on these characteristics, two haplotypes can be considered as ancestral within the MA gene pool: haplotype G for MI and haplotype T for MII. We also found one haplotype (H) in the MI group, which, despite not satisfying all ancestral requirements, had a relatively high frequency, although lower than the G haplotype (Fig. 7, Table 4).

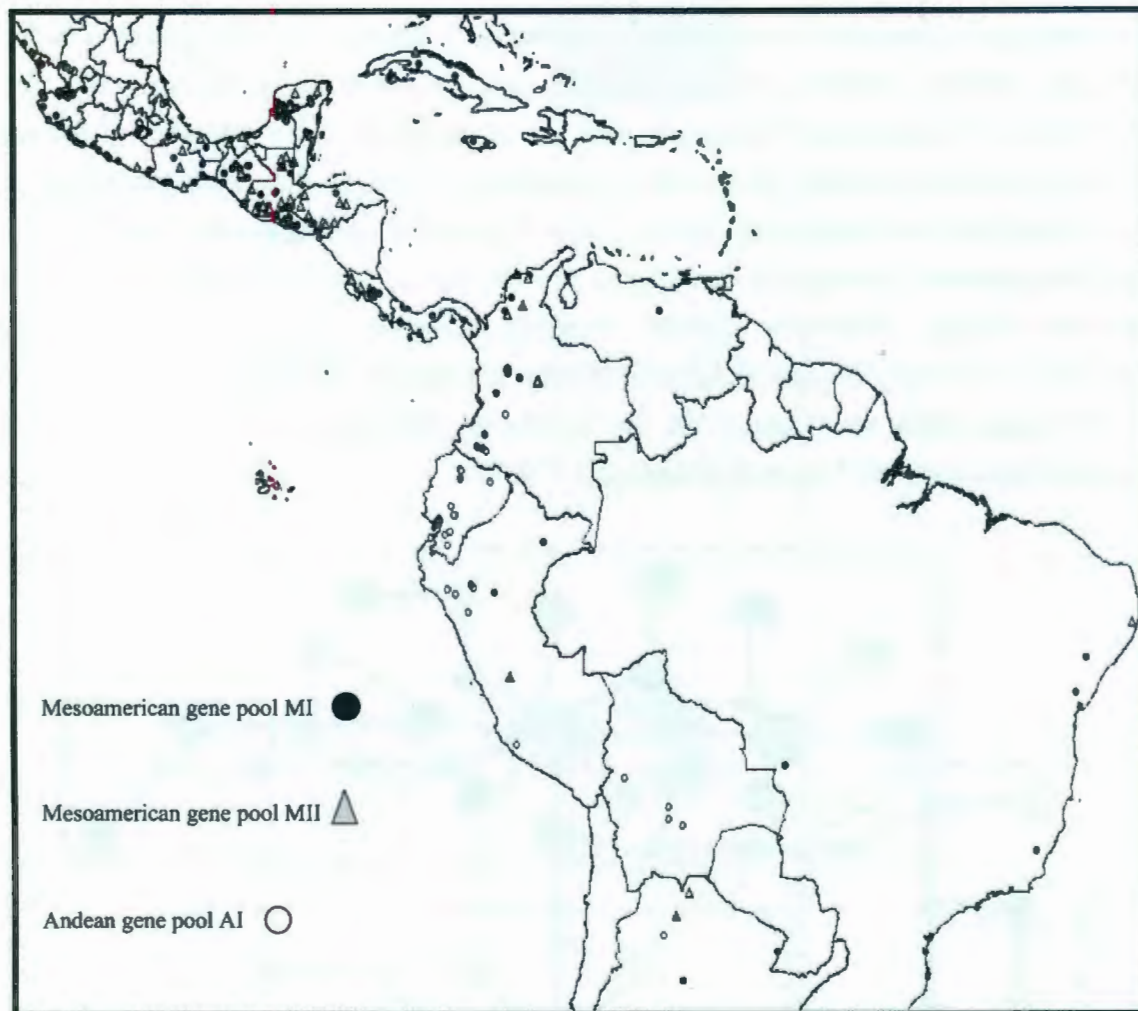


Figure 6. Geographic distribution of wild and domesticated accessions of gene pools of *P. lunatus* in America based on the groups observed in the maximum likelihood tree.

The ancestral haplotype G is the most common and the most widespread geographically (located in Mexico, Central and South America). This haplotype was present in wild and domesticated accessions that formed MI. The wild accessions with haplotype G were collected mostly from northwestern and central-western Mexico (Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Guerrero, Oaxaca and Chiapas). Domesticated accessions that carried the G haplotype had a wider distribution, which included Mexico, the Caribbean, Central and South America (Table 4). Within group MI, eight haplotypes were closely related to each other, and many of these were derived from ancestral haplotype G (Fig. 7). Haplotype H, which also presented a relatively high frequency in wild and

domesticated accessions of M1 group, is distributed in Mexico (Sinaloa, Jalisco, Colima, Puebla, Oaxaca, Veracruz, Campeche) and less frequently in Guatemala (only one accession). Domesticated accessions with the H haplotype were restricted to Mexico (Veracruz and the Yucatan Peninsula) and Guatemala, although they were more frequent in Guatemala (five accessions) (Table 4). The T ancestral haplotype was present in wild and domesticated accessions that formed the MII group. This haplotype was found in southern Mexico (Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Chiapas, Tabasco, Campeche and Yucatan), but mainly in Central America (Belize, Guatemala, El Salvador, Honduras and Costa Rica) (Table 3). In group MII, six haplotypes were closely related, with many of these derived from the T ancestral haplotype (Fig. 7).

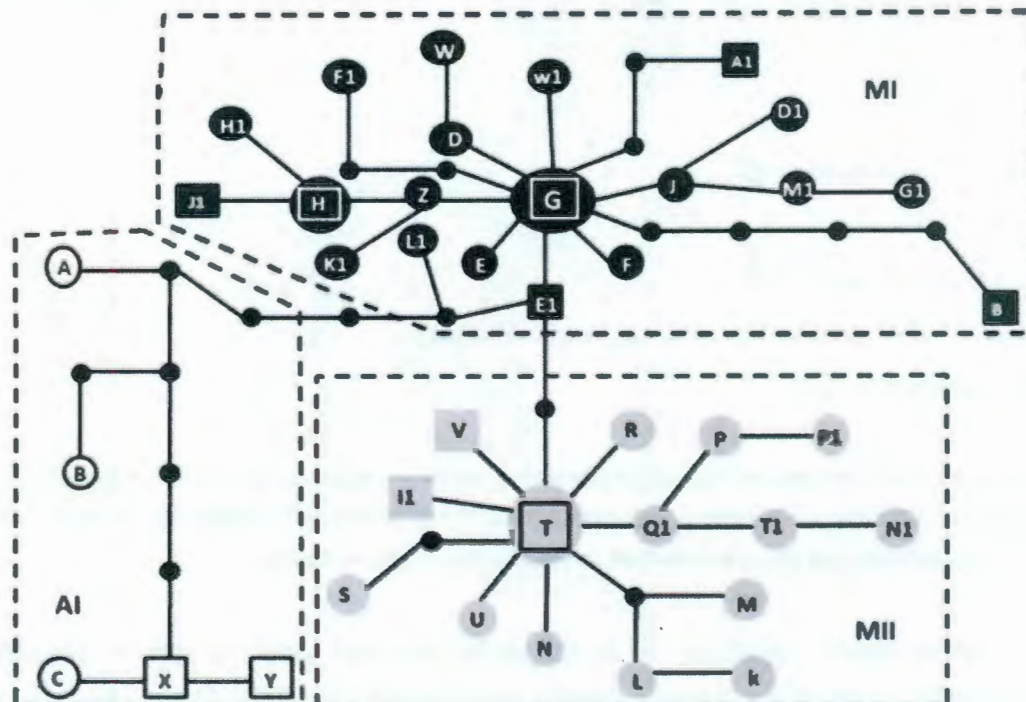


Figure 7. Haplotype network of cpDNA showing the relationships between wild and domesticated accessions of *P. lunatus*. Haplotypes are represented by capital letters. Haplotypes enclosed in a circle and box are haplotypes present in wild and domesticated accessions, haplotypes enclosed in a circle are haplotypes present only in wild accessions; haplotypes enclosed in a square are haplotypes present in domesticated accessions; haplotypes in black belong to the M1 group, haplotypes in gray belong to the MII group and haplotypes in white belong to the AI group.

Table 4. Geographic distribution of haplotypes with major frequency G, T and H. and ancestral haplotypes G and T found in wild and domesticated accessions of Mesoamerican gene pool of lima bean.

Country/State	Haplotype							
	Wild accessions				Domesticated accessions			
	G	T	H	Total	G	T	H	Total
Mexico	40	12	14	66	22	0	4	26
Sinaloa	1		3	4				
Nayarit*	5			5	1			1
Jalisco*	5		4	9				
Colima			2	2				
Guerrero*	6	1		7				
Morelos	2			2	1			1
Puebla	1		1	2				
Oaxaca	2	2	1	5	1			1
San Luis Potosí					1			1
Tamaulipas	1			1				
Veracruz	3	2	1	6				
Chiapas*	5	3		8	4		1	5
Tabasco	1	1		2				
Campeche*	7	1	2	10	8		1	9
Yucatán	2	2		4	2		1	3
Quintana roo					2		1	3
Belize		1		1				
Cuba					3			3
Guatemala*	3	17	1	21	8	1	5	14
El salvador		1		1	6			6
Honduras*	1	4		5		1		1
Costa Rica*		6		6	4	5		9
Jamaica					1			1
Panama					2			2
Venezuela					1			1
Colombia	1	4		5	11			11
Ecuador					1			1
Peru					3			3
Argentina					3			3
Brazil					6*			6
Total	47	45	15	107	69	7	9	85

*Areas with highest frequency of haplotypes

Genetic structure

Based on the existence of the three groups found, the genetic structure was assessed using three comparisons: (1) MI vs MII, (2) MI vs AI and (3) MII vs AI. The N_{ST} and G_{ST} values indicated a high degree of differentiation among the three groups observed (N_{ST} : MI vs MII = 0.61, MI vs AI = 0.80, MII vs AI = 0.75; and G_{ST} : MI vs MII = 0.30, MI vs AI = 0.18, MII vs AI = 0.27).

Genetic diversity and founder effect in Lima bean

Observing the existence of clusters in the ML tree and haplotype network, we calculated the genetic diversity at the species and groups levels observed here. The observed level of diversity for both levels was high (Table 5). The groups formed within the MA gene pool (MI and MII) had similar levels of diversity ($H_d = 0.48$ and $H_d = 0.47$, respectively). The reduction in genetic diversity (founder effect) was calculated at two levels: (1) species: all wild accessions versus all domesticated accessions, (2) groups: wild accessions vs domesticated accessions of group AI, and wild accessions vs domesticated accessions of group MI (Table 6). The founder effect in MII was not analyzed due to the low number of domesticated accessions found within this group, which could lead to an underestimate of the level of genetic diversity and the level of reduction in the haplotype diversity and the nucleotide diversity in this group (Gutiérrez-Salgado et al. 1995; Fofana et al. 1997). At the species level, the reduction in genetic diversity ($\%r$) was high ($H_d = 29.76\%$ and $\pi = 34.64\%$; Table 6). At the group level, AI had the highest reduction in diversity ($H_d = 68.78\%$ and $\pi = 93.68\%$); however, this reduction may be due to the limited number of accessions evaluated for this gene pool. MI also had a strong reduction in diversity ($H_d = 58.67\%$ and $\pi = 60.83\%$). In all cases, the genetic diversity was higher in wild accessions than in domesticated ones (Table 6).

Table 5. Indices of genetic diversity in the groups observed in the Lima bean including wild and domesticated accessions, calculated from cpDNA sequences.

Group	<i>N</i>	<i>H</i>	$H_d \pm SD$	<i>S</i>	$\pi \pm SD$
MI	168	20	0.487 ± 0.045	30	0.00112 ± 0.00014
II	68	15	0.473 ± 0.075	15	0.00089 ± 0.00018
AI	27	5	0.566 ± 0.086	8	0.00118 ± 0.00041
Total	262	40	0.746 ± 0.023	40	0.00240 ± 0.00014

N = Number of individuals tested; *H* = number of haplotypes; H_d = haplotype diversity; *S* = number of sites segregating; π = nucleotide diversity; SD = standard deviation.

Table 6. Indices of genetic diversity and founder effect in wild and domesticated accessions of Lima bean, calculated from cpDNA sequence data.

Group	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>PI</i>	<i>H</i>	<i>Hd</i> ± SD	π ± SD	% <i>r</i>
Total wild	151	34	18	29	0.803±0.021	0.00306±0.00018	29.76
Total domesticated	111	15	6	12	0.564±0.051	0.0020±0.00023	34.64
AI wild	10	7	3	3	0.378±0.181	0.00190±0.00090	68.78
AI domesticated	17	1	0	2	0.118±0.101	0.00012±0.00010	93.68
MI wild	80	20	4	14	0.634±0.054	0.00143±0.00019	58.67
MI domesticated	85	9	2	6	0.262±0.061	0.00056±0.00016	60.83

N = Number of accessions; *S* = number of polymorphic sites; *PI* = number of informative sites; *Hd* = haplotype diversity; π = nucleotide diversity; SD = standard deviation and %*r* = founder effect, first value was obtained from *Hd*, and second value was obtained from π .

DISCUSSION

Patterns of variation in trnL-trnF and atpB-rbcL in P. lunatus

The two cpDNA regions used in our study have proven to be useful tools for studies of domestication in Lima bean, due to the polymorphism detected at the population level and in previous phylogeographic studies (Motta-Aldana et al. 2010; Serrano-Serrano et al. 2010). Despite the observed difference in the size of the two noncoding chloroplast regions, we observed that the percentage of informative sites (*trnL-trnF* = 220 and *atpB-rbcL* = 221) and the GC content were very similar in both regions. Furthermore, both spacers are rich in AT (*trnL-trnF* = 38% A and 37% T; *atpB-rbcL* = 32% A and 41% T). However, the percentage of indels was considerably higher in the *atpB-rbcL* spacers. Considering the differences in the length of the two cpDNA spacers, we note that *trnL-trnF* spacer was more variable. This high degree of variability in the *trnL-trnF* spacer has been reported by others (Borsch et al. 2003; Sánchez del-Pino et al. 2007). On the other hand, levels of variability observed here in the *atpB-rbcL* spacer were higher than those reported by Chiang and Schaal (2000) in the moss family Hylocomiaceae; however, this result is expected because substitution rates of the spacer are much lower in mosses than in vascular plants (Chiang and Schaal 2000). Finally, even though *atpB-rbcL* spacer was less variable, Borsch and Quandt (2009) indicated that the rapid evolution of highly variable AT-rich stretches and regions outside these homonucleotide stretches facilitates distinguishing

different haplotypes within species, as done with ferns (Su et al. 2005). Our results confirm the usefulness and value of the variability of the *atpB-rbcL* and *trnL-trnF* markers chosen to resolve the issues addressed in our study.

Organization of genetic diversity of *P. lunatus* in its natural distribution area

The results of the ML tree and haplotype network (Figs. 5 and 7) allowed us to determine, in addition to the two widely recognized gene pools in lima bean (Mesoamerican and Andean), the presence of two gene pools inside the MA gene pool (MI and MII), each with a well-defined geographical range. The high level of genetic differentiation observed in the analyzed accessions ($N_{ST} = 0.61-0.80$ and $G_{ST} = 0.18-0.30$) supported the existence of the three groups observed. The values of N_{ST} were higher than those reported by Serrano-Serrano et al. (2010) for wild Lima bean and three to four times higher than those reported for common bean (Kwak and Gepts 2009; Nanni et al. 2011). The G_{ST} values obtained are comparable to those reported in previous studies for *P. lunatus* (Maquet et al. 1997; Caicedo et al. 1999; Martínez-Castillo et al. 2006, 2007), as well as for *P. vulgaris* (Zizumbo-Villarreal et al. 2005) and *P. acutifolius* (Muñoz et al. 2006).

The existence of groups MI and MII inside the MA gene pool can be explained by their very early migration from their sites of origin and subsequent spread, which was disrupted by fragmentation events and/or successive extinction and recolonization created by the turbulent geological history of much of Mesoamerica and Central America (Serrano-Serrano et al. 2010). A similar scenario has been reported for common bean (Chacón et al. 2007), a species that also has a multiple domestication pattern, similar to that of Lima bean. MI and MII may have remained genetically distinct as a result of particular biological characteristics of the species, e.g., a reproductive system with a predominance of autogamy, a short life cycle and limited dispersal ability of pollen and seeds (Baudoin et al. 2004, Maquet et al. 1997). Together, these three aspects may lead to isolation by distance since nearby populations are more likely to exchange gametes than are those populations that are further apart. Thus, limited gene flow leads to gene pools that accumulate a single genetic variation as a result of mutation, genetic drift and selection under different ecological conditions (Serrano-Serrano et al. 2010).

Lima bean domestication

The results confirmed the existence of the two major gene pools previously reported for *P. lunatus* (AG and MA gene pools) and supported the hypothesis that Lima bean underwent at least two independent domestication events separated by time and space, as proposed by various groups (Gutiérrez-Salgado et al. 1995, Maquet et al. 1997; Lioi et al. 1998; Fofana et al. 2001, Motta-Aldana et al. 2010). The haplotype network and geographic distribution map (Figs. 6 and 7) support the hypothesis that the domestication area for AG took place in mid-altitude western valleys between Ecuador and Perú in South America, as previously suggested (Debouck et al., 1987; Gutiérrez-Salgado et al. 1995; Fofana et al. 2001, Motta-Aldana et al. 2010).

In the case of the MA gene pool, the results obtained with the ML tree, the distribution maps and the haplotype network (Figs. 5-7) showed the existence of two groups: MI and MII; each group consisted of both wild and domesticated accessions, with a defined geographic distribution and represented by a single ancestral haplotype: haplotype G for MI and haplotype T for MII (Fig. 7). Taken together, these results provide evidence of at least two domestication events in the MA gene pool of Lima bean. Other authors have also reported the existence of these two groups (Motta-Aldana et al. 2010; Serrano-Serrano et al. 2010, 2012), but did not provide evidence of multiple domestications probably because their data came from fewer accessions than in our present study.

Regarding the area of domestication, in the MI group, haplotype G was the most frequent and widely distributed in the domesticated accessions (Mexico, Cuba, Jamaica, Guatemala, El Salvador, Costa Rica, Panama, Venezuela, Colombia, Ecuador, Peru, Argentina and Brazil). In wild accessions, their distribution was more restricted, localized mainly in the area comprising the states of Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Guerrero and Oaxaca, coastal states of northwestern and western central Mexico. Haplotype H, also found in the MI group at a relatively high frequency, was mainly distributed in Mexico (Sinaloa, Jalisco, Colima, Puebla, Oaxaca, Veracruz, Campeche, Yucatan and Quintana Roo) and Guatemala (Alta Verapaz, Jalapa, Huehuetenango). However, in the haplotype network (Fig. 7), we can see that haplotype H is derived from haplotype G, so its presence can be the result of post-domestication events. Considering the genetic relationships observed between wild and domesticated accessions carrying haplotype G (located in northwestern

and western central Mexico) and the close relationship with other wild and domesticated haplotypes of this area (many haplotypes are derived from haplotype G), the geographical origin of domestication for MI could have been a specific site within this region. In this regard, western central Mexico has been proposed as an area of domestication for other major Mesoamerican crops: common bean (Kwak et al. 2009; Kwak and Gepts, 2009; Nanni et al. 2011), jocote (*Spondias purpurea*) (Miller and Schaal 2005), maize (Matsuoka et al. 2002; Fukunaga et al. 2005) and squash (Sanjur et al. 2002). In addition, this region is also considered the likely area for the origin of agriculture in Mesoamerica (Piperno et al. 2006; Ranere et al. 2009; Zizumbo-Villarreal and Colunga García-Marín 2010).

The results generated from this work on domestication for MI are consistent, in part, with other reports. Kaplan (1965), on the basis of archaeobotanical evidence, pointed to Guerrero and Oaxaca as probable areas of domestication of the Lima bean type Sieva. Motta-Aldana et al. (2010), using molecular evidence, reported western central Mexico as the putative domestication area of *P. lunatus*, in particular in the northern and northwestern areas of the Isthmus of Tehuantepec in the states of Oaxaca and Guerrero. Compared to the results of these studies, our results indicate that the specific site of domestication to MI could be located in a larger region encompassing northern and western central Mexico, from Sinaloa to Oaxaca, as previously discussed. These differences may be attributed to our study covering a large sample area and included more wild accessions from northwestern and western central Mexico, areas that were not sampled by Motta-Aldana et al. (2010) or others (Gutiérrez-Salgado et al. 1995; Fofana et al. 2001). Our results agree more with those reported by Serrano-Serrano et al. (2012) who, through sequencing of the ITS region, suggested the regions of Nayarit-Jalisco and Guerrero-Oaxaca in western central Mexico as the possible area of domestication of MI.

The proposed domestication area of MI is adjacent to the core area of domestication of crops that have been considered as the founder crops of agriculture in Mesoamerica. This scenario is similar to that for lentil (*Lens culinaris* Medik.) (Alo et al. 2011), whose center of domestication is also adjacent to the domestication area of wheat (*Triticum monococcum* L.) and chickpea (*Cicer arietinum* L.), founder crops of agriculture in the Fertile Crescent (Heun et al. 1997; Abbo et al. 2003; Luo et al. 2007; 2010). It is also important to note that the proposed domestication area for MI Lima bean, has also been

proposed for the domestication not only for common bean, but also for another domesticated species of *Phaseolus*, the tepary bean (*P. acutifolius*). Muñoz et al. (2006), using molecular tools, found evidence that the tepary bean may have originally been domesticated in the states of Sinaloa and Jalisco. Altogether, such evidence points to the importance of early groups of humans in northern and western central Mexico in the process of domesticating Mesoamerican beans.

In the case of the MII group, MII presented a more restricted geographical distribution compared to MI. The wild accessions carrying haplotype T, characteristic of the MII group, had greater geographical distribution, ranging from southern Mexico (from the east of the Isthmus of Tehuantepec) to Central America, but mainly in Central America. This haplotype was also detected less frequently in some regions of South America. Domesticated accessions possessing the T haplotype were only found at very low frequency in Guatemala and Honduras (1 population each), and slightly more often in Costa Rica (5 accessions). Although the number of domesticated accessions of MII possessing the haplotype T is small (7 accessions), its restricted geographical location allow us to suggest that the geographical origin of domestication could be located at a specific site located in the region of Guatemala, Honduras and Costa Rica. A better sampling involving a larger number of domesticated accessions of this region and accessions from South America is necessary to gain a better picture of the domestication of MII. In this regard, previous studies have suggested Guatemala as a possible area of domestication and diversification of *P. lunatus* (Sauer 1994; Gutiérrez-Salgado et al. 1995; Fofana et al. 2001).

Guatemala and Honduras are part of a major cultural area of Mesoamerica, the Mayan culture, which has cultivated Lima beans in their traditional agricultural system, known as milpa, since pre-Columbian times, dated by archaeological records from Dzibilchaltún (an archaeological zone located north of Yucatan) at 1200 years ago (Kaplan 1965). If the archaeological record is reliable and if agriculture in the Mayan area first started in the highlands and subsequently moved to the lowlands (Zizumbo-Villarreal and Colunga García-Marín 2010), Lima bean must have been domesticated in this region hundreds of years ago. However, the oldest archaeological evidence in Mesoamerica related to Lima bean dates fully domesticated plants to less than 1300 to 1400 years ago

(Kaplan and Lynch 1999). Central America has also been marked as a center of domestication for two other species of *Phaseolus*. Schmit and Debouck (1991), on the basis of morphological, ecological and biochemical similarities between wild and domesticated piloya bean (*P. polyanthus* Greenman) of Guatemala, pointed to this region as its putative domestication area. Spataro et al. (2011), using molecular evidence based on the SSR marker, reported Guatemala–Honduras as a possible domestication area for runner bean (*P. coccineus* L.).

An alternative scenario to explain the observations on the domestication of MII is the prevalence of a single domestication event in the MA gene pool and dispersal events after domestication. Because we found that few domesticated accessions carry haplotype T, these accessions may have been domesticated in a specific place in northern or western central Mexico. Subsequently, these domesticated forms extended their distribution to reach the region of Guatemala, Honduras and Costa Rica, where they would have undergone post-domestication diversification or have captured cpDNA from local wild populations. A similar sequence was recently proposed by Serrano-Serrano et al. (2012); after a single domestication for Lima bean in western central Mexico, the domesticated forms dispersed along natural corridors created by river systems such as the Balsas-Mezcala and Grijalva, reaching areas of Guatemala and Yucatan. During this dispersal, Lima beans experienced post-domestication diversification, as indicated by the presence of unique domesticated haplotypes of Lima bean in Guatemala, El Salvador and Colombia (Serrano-Serrano et al. 2012). However, with the available data, this hypothesis cannot yet be proven. Supplementary data from nuclear DNA perhaps can help us resolve this question.

Interestingly, the domestication pattern found in the Mesoamerican gene pool of *P. lunatus* is very similar to that reported by Miller and Schaal (2005) for jocote (*S. purpurea*). These authors, using an intergenic spacer of chloroplast DNA (*trnG-trnS*) and a phylogeographic approach, showed the existence of multiple domestications for this species and suggested western central Mexico and Central America as possible areas of jocote domestication.

Genetic diversity and founder effect in Lima bean

High values of genetic diversity were observed at the species and group levels (Table 5). At the group level, AI had the highest genetic diversity, despite its low number of accessions and their restricted geographic range (Table 5). This result can be attributed to the Andean origin of the species (Fofana et al. 1999; Maquet et al. 1999; Serrano-Serrano et al. 2010). The levels of diversity of the MI and MII groups, reported here are consistent with those found in previous studies (Nienhuis et al. 1995; Martínez-Castillo et al. 2006, Motta-Aldana et al. 2010). These high values of diversity can be explained by different factors: (1) high levels of cross pollination (Baudoin et al. 2004), (2) a wide geographic range (from the United States to northern Argentina) covering a wide spectrum of ecological conditions (Gutiérrez-Salgado et al. 1995; Lopez-Soto et al. 2005), (3) the domesticated varieties have been subjected to selection pressures from the different human populations who have grown them (Ballesteros 1999).

The high percentages of reduction in genetic diversity (%r) observed in our study are similar to those reported by Motta-Aldana et al. (2010). These results are comparable to those reported in other domesticated crops, both open-pollinated, as in the case of maize (*Zea mays* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.) with observed levels of reduction in genetic diversity of 38% and 31%, respectively (Tenaillon et al. 2004, Wright et al. 2005, Muller et al. 2006), as well as in species with autogamous trends such as soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) (Hyten et al. 2006), lentil (*Lens culinaris* Medik.) (Alo et al. 2011) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) (Nanni et al. 2011) with 34%, 40% and 54-69% reduction in genetic diversity, respectively. The reduction in haplotype and nucleotide diversity observed in our data suggests the existence of a founder effect during domestication at the species and group levels (AI and MI). Specifically for the MA gene pool, the existence of a founder effect in MI is also reflected in the fact that the haplotypes that were more frequently observed in domesticated accessions are a subset of the haplotypes found in wild accessions (Tables 2 and 3). This result agrees with previous studies that have reported a reduction in genetic diversity of domesticated accessions of this species (Motta-Aldana et al. 2010; Martínez-Castillo et al. 2011). Thus, during the time of domestication of the MA gene pool, both the number of alleles and the relative abundance of alleles present in the intergenic spacers of chloroplast *atpB-rbcL* and *trnL-trnF*, changed under the influence of human selection, as observed in other crops (Miller

and Schaal 2005). On the other hand, in the MA gene pool, six haplotypes found in domesticated accessions were not found in wild accessions. It is important to note that the existence of unique haplotypes in domesticated accessions could be due to incomplete sampling of wild accessions that have such haplotypes or be the result of new alleles that originated during the cultivation of domesticated accessions.

CONCLUSIONS

Our results confirm the existence of the two major gene pools of Lima bean: the Mesoamerican and Andean, each domesticated in a different place. The incorporation of new accessions in our study, as well as a greater geographic range sampled in Mexico and Guatemala, were found to be key aspects to confirm the existence of MI and MII groups within the Mesoamerican gene pool and to determine the likely areas of domestication for both groups. Our study, in conjunction with those of Serrano-Serrano et al. (2010; 2012) and Motta-Aldana et al. (2010), provide the basis for considering the existence of three major gene pools in the natural distribution range of *P. lunatus*: AI, MI and MII, rather than only two (Andean and Mesoamerican) as commonly assumed.

Based on the evidence reported here, we propose that MI was domesticated in western central Mexico, in a specific site within the area currently occupied by the states of Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán and Guerrero. This result highlights the importance of ancient human groups from this region in the origin and early development of agriculture in Mesoamerica. In particular, this result emphasizes the role of these groups in the domestication of beans, since in western central Mexico, there is evidence of domestication of at least two other species of *Phaseolus* (common bean and tepary bean). This work also provides evidence of a possible domestication event for MII, which would have occurred at a specific site within the area placed among Guatemala, Honduras and Costa Rica, the Mesoamerican region where the great Mayan culture flourished. However, better sampling is needed to determine more clearly the existence of this second event of domestication. Finally, our results confirmed that genetic diversity was greatly reduced in the domesticated populations compared to wild population at the level of the entire species, and within the MA gene pool of lima bean, supporting the existence of a founder effect within this specie as a result of domestication.

ACKNOWLEDGEMENTS

This paper is part of the first author's Ph. D. Dissertation at the Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., postgraduate studies in Biological Sciences Option Natural Resources. The research was conducted under the direction of Jaime Martínez-Castillo. The first author thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Mexico for the scholarship for his postgraduate studies, Ciencia Básica-CONACYT (project number 82642) and the National Geographic Society (grant number 8622-09) for the economic support to carry out this research.

REFERENCES

- Abbo, S., J. Berger, N.C. Turner (2003). Evolution of cultivated chickpea: four bottlenecks limit diversity and constrain adaptation. *Functional Plant Biology*, 30, 1081–1087.
- Abbo, S., S. Lev-Yadun, A. Gopher (2010). Agricultural origins: centers and noncenters: A near eastern reappraisal. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29, 317–328.
- Aguilar-Meléndez, A., L.P. Morell, L.M. Roose and K. Seung-Chul (2009). Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum*; *solanaceae*) from Mexico. *American Journal of Botany*, 96, 1190-1202.
- Alo, F., J.B. Furman, E. Akhunov, J. Dvorak and P. Gepts (2011). Leveraging genomic resources of model species for the assessment of diversity and phylogeny in wild and domesticated lentil. *Journal of Heredity*, 102, 315-329.
- Allaby, R.G., D.Q. Fuller, A. Terence (2008). The genetic expectations of a protracted model for the origins of domesticated crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105, 13982-13986.
- Andrés, T. (1990). Biosystematics theories on the origin and breeding potential of *Cucurbita ficifolia*. In: *Biology and Utilization of the Cucurbitaceae*. Bates DM, Robinson RW, Jeffrey C (eds.) Cornell University, New York, pp 102–119.
- Ballesteros, P.G. (1999). Contribuciones al conocimiento del frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) en América tropical. Tesis de Doctorado en Ciencias C.P. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. 386.
- Baudoin, J. P., O. Rocha, J. Degreef, A. Maquet, L. Guarino (2004). Ecogeography, Demography, Diversity and Conservation of *Phaseolus lunatus* L. in the Central

- Valley of Costa Rica. Systematic and ecogeographic studies on crop gene pools. Internacional Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 94 p.
- Borsch, T., K.W. Hilu, D. Quandt, V. Wilde, C. Neinhuis C and W. Barthlot (2003). Noncoding plastid *trnT-trnF* sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms. *Journal of Evolutionary Biology*, 16, 558–576.
- Borsch, T., D. Quandt (2009). Mutational dynamics and phylogenetic utility of noncoding chloroplast DNA. *Plant Systematics Evolution*, 282, 169–199.
- Buckler, E.S., N.M. Goodman, T.P. Holstford, J.F. Doebley, J. Sánchez (2006). Phylogeography of the wild subspecies of *Zea mays*. *Maydica*, 51, 123–134.
- Caicedo, A.L., E. Gaitán, M.C. Duque, O. Toro Chica, D.G. Debouck and J. Thome (1999). AFLP fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from south America. *Crop Science*, 39, 1497–1507.
- Chacón, M.I., S. B. Pickersgill, D.G. Debouck (2005). Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the mesoamerican and andean cultivated races. *Theoretical and Applied Genetics*, 110, 432–444.
- Chacón, M.I., B. Pickersgill, D.G. Debouck, and S.J. Arias (2007). Phylogeographic analysis of the chloroplast DNA variation in wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Americas. *Plant Systematic and Evolution*, 266, 175–195.
- Chiang, TY, and Schaal BA (2000). Molecular evolution of the *atpB-rbcL* noncoding spacer of chloroplast DNA in the moss family Hylocomiaceae. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 41, 85–92.
- Chiang, T.Y., B.A. Schaal, C.L. Peng (1998). Universal primers for amplification and sequencing a non-coding spacer between the *atpB* and *rbcL* genes of chloroplast DNA. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 39, 245–250.
- Clement, M, Posada D, Crandall K (2000). TCS: a computer program to stimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9, 1657–1660.
- Debouck, D.G. (2011). Cahiers de phaseologie: Section Paniculati, p. 335. CIAT, Cali, Colombia. <http://isa.ciat.cgiar.org/urg/showunitfiles.do?type=unitfiles&category=unitfiles&by=collection>. [accessed in april 2011].
- Debouck, D.G., J.H. Liñan Jara, A. Campana Sierra, J.H. de la Cruz Rojas (1987). Observations on the domestication of *Phaseolus lunatus* L. *Plant Genetic Resources Newslett*, 70, 26–32.
-

- Doyle, J., and J. Doyle (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- Doebley, J.F., B.S. Gaut, B.D. Smith (2006). The molecular of crop domestication. *Cell*, 127, 1309-1321.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 1792-1797.
- Fofana, B., X. Vekemans, E. du Jardin, J.P. Baudoin (1997). Genetic diversity in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by RAPD markers. *Euphytica*, 95, 157-165.
- 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 Genetics*, 98, 202-212.
- Fofana, B., P. du Jardin, J.P. Baudoin (2001). Genetic diversity in the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by chloroplast DNA (cpDNA) variations. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48, 437-445.
- Fukunaga, K., J. Hill, Y. Vigouroux, Y. Matsuoka, G.J. Sánchez, K. Liu, E.S. Buckler and F. Doebley (2005). Genetic diversity and population structure of teocintle. *Genetics*, 169, 2241-154.
- Fuller, Q.D. (2007). Contrasting patterns in crop domestication and domestication rates: recent archaeobotanical insights from the old world. *Annals of Botany*, 100, 903-924.
- Gepts, P. (2004). Crop domestication as a long-term selection experimental. *Plant Breeding Reviews*, 24, 34
- Gepts, P. (1990). Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabaceae) beans. *Economyc Botany*, 44, 28-38.
- Gepts, P., and D. G. Debouck (1991). Origin, domestication, and evolution of the common bean, *Phaseolus vulgaris* in: *Common Beans*. Voysest O. and Schoonven A.V. (eds.). *Research for Crop Improvement*, pp. 7-53.
- Gutiérrez-Salgado, A., P. Gepts, D.G. Debouck (1995). Evidence for two gene pools of the Lima beans, *Phaseolus lunatus* L., in the Americas. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 42, 15-28.

- Hall, T. (1999). BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hammer, K. (1984). Das domestikations syndrom. *Kulturpflanze*, 32, 11-34.
- Harlan, J.R. (1992). *Crops and Man*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Madison.
- Heun, M., R. Schafer-Pregl, D. Klawan, R. Castagna, M. Accerbi, B. Borghi, F. Salamini (1997). Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science*, 278, 1312–1314.
- Holwerda, B.C., S. Jana, W.L. Crosbi (1986). Chloroplast and mitochondrial DNA variation in *Hordeum vulgare* and *Hordeum spontaneum*. *Genetics*, 114, 1271–1291.
- Hyten, D.L., Q. Song, Y. Zhu, I.Y. Choi, R.L. Nelson, J.M. Costa, J.E. Specht, R.C. Shoemaker, P.B. Cregan (2006). Impacts of genetic bottlenecks on soybean genome diversity. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*, 103, 16666–16671.
- Kaplan, L., and T.F. Lynch (1999). *Phaseolus* (Fabaceae) in archaeology: AMS radiocarbon dates and their significance for pre-colombian agriculture. *Economyc Botany*, 53, 261–272.
- Kaplan, L. (1965). Archaeology and domestication in American *Phaseolus* (beans). *Economyc Botany*, 19, 358–368.
- Kress, J.W., J.K. Wurdack, A.E. Zimmer, A.L. Weigt and H.D. Janzen (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*, 102, 8369-8374.
- Kwak, M., J. Kami, P. Gepts (2009). The putative mesoamerican center of domestication of *Phaseolus vulgaris* L. is located in the Rio Lerma-Santiago basin of Mexico. *Crop Science*, 49, 554-563.
- Kwak, M., P. Gepts (2009). Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 118, 979–992.
- Ladizinsky, G. (1985). Founder effect in crop-plant evolution. *Economyc Botany*, 39, 191-199.
- Ladizinsky, G. (1998). How many tough-rachis mutants gave rise to domesticated barley? *Genetic Resources and Crop Evolution*, 45, 411–414.

- Lioi, L. (1996). Phaseolin diversity in wild Lima bean (*Phaseolus* L.) in american centres of origin. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 43, 575–580.
- Lioi, L., and I. Galazo (2002). Oligonucleotide DNA fingerprinting revealing polymorphism in *Phaseolus lunatus* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49, 53-58.
- 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 and I. Galasso (1998). Isozyme diversity, RFLP of the rDNA and phylogentic affinities among cultivated lima beans, *Phaseolus lunatus* (*Phabaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 213, 153-164.
- López Soto, J.L., C.J.A. Ruiz, G.J.J. Sánchez, I.R. Lépiz (2005). Climatic adaptation of 25 wild bean species (*Phaseolus* spp) in Mexico. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28, 221-230.
- Luo, M.C., Z.L. Yang, F. You, T. Kawahara, J. Waines, J. Dvorak (2007). The structure of wild and domesticated emmer wheat populations, gene flow between them, and the site of emmer domestication. *Theoretical and Applied Genetics*, 114, 947–959.
- Lynch, M., and J.T. Crease (1990). The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Molecular Biology and Evolution*, 7, 377-394.
- Maquet, A., and J.P. Baudoin (1997). Aperçu de la distribution néotropicale de *Phaseolus lunatus*. (A survey of the neotropical distribution of *Phaseolus lunatus*). *Belgian Journal of Botany*, 130, 93-116.
- Maquet, A., B.I. Zoro Bi, M. Delvaux, B. Wathelet, J.P. Baudoin (1997). Genetic structure of a lima bean base collection using allozyme markers. *Theoretical and Applied Genetic*, 95, 980–991.
- Maquet, A., X. Vekemans and J.P. Baudoin (1999). Phylogenetic study on wild allies of lima bean, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae) and implications on its origin. *Plant Systematics and Evolution* 218:43–54
- Martínez-Castillo, J., D.Zizumbo-Villarreal, P. Gepts, P. Colunga-García-Marín (2007). Gene flow and genetic structure in the wild–weedy–domesticated complex of *Phaseolus lunatus* L. in its Mesoamerican center of domestication and diversity. *Crop Science*, 47, 58-66.
- Martínez-Castillo, J., D. Zizumbo-Villarreal, P. Gepts, P. Delgado- Valerio, P. Colunga-García-Marín (2006). Structure and genetic diversity of wild populations of lima

- bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Yucatan peninsula, Mexico. *Crop Science*, 46, 1071–1080.
- Martínez-Castillo, J., D. Zizumbo-Villarreal, H. Perales-Rivera, P. Colunga-García-Marín (2004). Intraspecific diversity and morpho-phenological variation in *Phaseolus lunatus* L. from the Yucatan peninsula, Mexico. *Economic Botany*, 58, 354–380.
- Martínez-Castillo, J. (2005). Diversidad intraespecífica de *Phaseolus lunatus* L. e intensificación de la agricultura tradicional en la Península de Yucatán, México. Ph.D. Thesis, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México.
- Martínez-Castillo, J., L. Camacho-Pérez, J. Coello-Coello, R.H. Andueza-Noh (2011). 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.
- Matsuoka, Y., Y. Vigouroux, M.M. Goodman, G.J. Sanchez, E. Buckler, J. Doebley (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99, 6080-6084.
- Miller, A., and B. Schaal (2005). Domestication of a Mesoamerican cultivated fruit tree, *Spondias purpurea*. *Proceedings of the National Academy Science USA*, 36, 12801-12806.
- Motta-Aldana, J., M.L. Serrano-Serrano, H.J. Torres, C.G. Villamizar, D.G. Debouck, M.I. Chacón (2010). Multiple origins of lima bean landraces in the Americas: evidence from chloroplast and nuclear DNA polymorphisms. *Crop Science*, 50, 1773-1787.
- Muller, M.H., C. Poncet, J.M. Prosperi, S. Santoniand, J. Ronfort (2006). Domestication history in the *Medicago sativa* species complex: inferences from nuclear sequence polymorphism. *Molecular Ecology*, 15, 1589–1602.
- Müller, K. (2005). SeqState. Primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA datasets. *Applied Bioinformatics*, 4, 65-69.
- Muñoz, C.L., C.M. Duque, D.G. Debouck and W.M. Blair (2006). Taxonomy of tepary bean and wild relatives as determined by amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Crop Science*, 46, 1744-1754.
- Nanni, L., E. Bitocchi, E. Bellucci, M. Rossi, D. Rau, G. Attene, P. Gepts, R. Papa (2011). Nucleotide diversity of a genomic sequence similar to SHATTERPROOF (*PvSHP1*) in domesticated and wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 123, 1341-1357.

- Nei, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of The National Academy Sciences USA, 7, 3321-3323.
- Nei, M. (1987) Molecular Evolutionary Genetics. New York, USA.
- Nei, M., J.C. Miller (1990). A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. Genetics, 125, 873-879.
- Nienhuis, J., P. Skroch, J.B. Dos Santos (1995). Genetic relationships among cultivars and landraces of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. Journal of American Society Horticultural Science, 2, 300-306.
- Olsen, K.M., and B.A. Schaal (2001). Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: further evidence for a southern Amazonian origin of domestication. American Journal of Botany, 88, 131-142.
- Olsen, K.M., and B.A. Schaal (1999). Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. Proceedings of the National Academy Sciences USA, 96, 5586-5591.
- Orabi, J., G. Backes, A. Wolday, A. Yahyaoui, A. Jahoor (2007). The horn of Africa as a centre of barley diversification and a potential domestication site. Theoretical and Applied Genetic, 114, 1117-1127.
- Perry, L., and K.V. Flannery (2007). Precolumbian use of chilli peppers in the valley of Oaxaca, Mexico. Proceedings of the National Academy Sciences USA, 104, 11905-11909.
- Pickersgill, B. (2007). Domestication of plants in the Americas: Insights from mendelian and molecular genetics. Annals of Botany, 100, 925-940.
- Pickersgill, B. (1989). Cytological and genetical evidence on the domestication and diffusion of crops within the Americas. In: Foraging and Farming: The Evolution of Plant Exploitation. Harris D.R., Hillman G.C., (eds). Unwin Hyman, London. pp. 426-439.
- Piperno, D.R. (2006). Quaternary environmental history and agricultural impact on vegetation in Central America. Annals of the Missouri Botanical Garden, 93, 274-296.
- Piperno, D.R., J.E. Moreno, J. Iriarte, I. Holst, M. Lachniet, G. Jones, A.J. Ranere and R. Castanzo (2007). Late pleistocene and holocene environmental history of the

- Iguala valley, central balsas watershed of Mexico. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 104, 11874-11881.
- Piperno, D.R., A.J. Ranere, I. Holst, J. Iriarte, R. Dickau (2009). Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 106, 5019-5024.
- Posada, D., and K.C. Crandall (2001a). Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. Systematic Biology, 50, 580-601.
- Posada, D., and K.C. Crandall (2001b). Intraspecific gene genealogies: Trees grafting into networks. Trends in Ecology & Evolution, 16, 37-45.
- Ranere, A.J., D.R. Piperno, I. Holst, R. Dickau and J. Iriarte (2009). The cultural and chronological context of early Holocene maize and squash domestication in the central Balsas river valley, Mexico. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 106, 5014-5018.
- Rozas, J., J.C. Sánchez-Del Barrio, X. Messeguer, and R. Rozas (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics, 19, 2496-2497.
- Sánchez del-Pino, I., T. Borsch and J.T. Motley (2007). *trnL-F* and *rpl16* Sequence data and dense taxon sampling reveal monophyly of unilocular anthered *Gomphrenoideae* (Amaranthaceae) and an improved picture of their international relationships. Systematic Botany, 34, 57-67.
- Sanjur, O.I., D.R. Piperno, T.C. Andrés, W.B. 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. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 99, 535-540.
- Sauer, D.J. (1994). Historical Geography of Crop Plants. CRC Press, Los Angeles, C.A.
- Serrano-Serrano, M.L., J. Hernandez-Torres, G. Castillo-Villamizar, D.G. Debouck, M.I. Chacón (2010). Gene pools in wild lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Americas: Evidences for an Andean origin and past migrations. Molecular Phylogenetics & Evolution, 54, 76-87.
- Serrano-Serrano, M.L., R.H. Andueza-Noh, J. Martínez-Castillo, D. Debouck and M. Chacón (2012). Evolution and domestication of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Mexico: Evidence from ribosomal DNA. Crop Science doi: 10.2135/cropsci2011.12.

- Shaw, J., B.E. Lickey, T.J. Beck, B.S. Farmer, W. Liu, J. Miller, C.K. Siripun, T.C. Winder, E.E. Schilling and L.R. Small (2005). The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, 92, 142-166.
- Shaw, J., B.E. Lickey, E.E. Schilling and L.R. Small (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94, 275-288.
- Simmons, M., and H. Ochoterena (2000). Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 49:369–381.
- Schmit, V., and D.G. Debouck (1991). Observations on the *Phaseolus polyanthus* Greenman. *Economic Botany*, 45, 345-364.
- Spataro, G., B. Tiranti, P. Arcaleni, E. Bellucci, G. Attene, R. Papa, Z:P: Spagnoletti, V. Negri (2011). Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 122, 1281–1291.
- Su, Y.J., T. Wan, B. Zheng, Y. Jiang, P.Y. Ouyang and P.Y. Chen (2005). Genetic variation and phylogeographical patterns in *Alsophila podophylla* from southern China based on cpDNA *atpB-rbcL* sequence data. *American Fern Journal*, 95, 68-79.
- Swofford, D.L. (1998) PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Release 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou and J. Bouvet (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105-1109.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology & Evolution*, 28, 2731-2739.
- Tan, B., K. Liu, X. Yue, F. Liu, J.M. Chen, Q.F. Wang (2008). Chloroplast DNA variation and phylogeographic patterns in the Chinese endemic marsh herb *Sagittaria potamogetifolia*. *Aquatic Botany*, 89, 372–378.
- Tang, T., S. Shi (2007). Molecular population genetics of rice domestication. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49, 769–775.

- Tenaillon, M.I., J. U'Ren, O. Tenaillon, B.S. Gaut (2004). Selection versus demography: a multilocus investigation of the domestication process in maize. *Molecular Biology & Evolution*, 21, 1214–1225.
- Templeton, A.R., E. Boerwinkle and C.F. Sing (1987). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*, 117, 343–351.
- Vanichanon, A., K.N. Blake, D.J. Sherman, E.L. Talbert (2003). Multiple origins of allopolyploid *Aegilops triuncialis*. *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 804–810.
- Wright, S.I., I.V. Bi, S.G. Schroeder, M. Yamasaki, J.F. Doebley, M.D. McMullen, B.S. Gaut (2005). The effects of artificial selection on the maize genome. *Science*, 308, 1310–1314.
- Zeder, M.A., D.G. Bradley, E. Emshwiller, B.D. Smith (2006). Documenting Domestication. *New Genetic and Archaeological Paradigms*. University of California, London, England, 361.
- Zizumbo-Villarreal, D., P. Colunga-García Marín, E. Payró de la Cruz, P. Delgado-Valerio and P. Gepts (2005). Population structure and evolutionary dynamics of wild-weedy-domesticated complexes of common bean in a Mesoamerican region. *Crop Science*, 45, 1073-1083.
- Zizumbo-Villarreal, D., and P. Colunga-Garcia-Marín (2010). Origin of agriculture and plant domestication in west Mesoamerica. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57, 813–825.
- Zohary, D. (1999). Monophyletic vs polyphyletic origin of the crops on which agricultura was founded in the Near East. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46, 133-142.

RELACIONES GENÉTICAS ENTRE POBLACIONES SILVESTRES Y DOMESTICADAS DEL ACERVO GENÉTICO MESOAMERICANO DEL FRIJOL LIMA (*Phaseolus lunatus* L.): IMPLICACIONES SOBRE SU DOMESTICACIÓN.

INTRODUCCIÓN

El género *Phaseolus* posee alrededor de 70 especies (Freytag y Debouck, 2002), de las cuales cinco han sido domesticadas (Delgado-Salinas *et al.*, 1999; Gepts *et al.*, 1999). Una de éstas es el frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L.), la cual representa la segunda especie domesticada económicamente más importante a nivel mundial dentro del género, solo después del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Esta especie se originó y domesticó en América tropical hace aproximadamente 10,000 años (Kaplan y Lynch, 1999; Baudoin, 1991) y su origen, evolución y distribución han sido ampliamente estudiados (Caicedo *et al.*, 1999; Fofana *et al.*, 1999; Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995; Maquet, 1995). Estos estudios habían permitido reconocer la existencia de dos acervos génicos principales: el mesoamericano (GM) y el andino (GA), ambos conteniendo tanto poblaciones silvestres como domesticadas. Sin embargo, estudios más recientes han indicado que la organización genética de *P. lunatus* es más compleja, especialmente en el acervo génico mesoamericano en el cual se ha sugerido la existencia de dos grupos genética y geográficamente bien definidos: mesoamericano I y mesoamericano II (MI y MII respectivamente; Serrano-Serrano *et al.*, 2012; Motta-Aldana *et al.*, 2010; Serrano-Serrano *et al.*, 2010).

Actualmente, en el frijol Lima se reconocen dos centros de domesticación independientes en tiempo y espacio, que involucran a los acervos génicos principales antes citados: uno ubicado en América del Sur y el otro en Mesoamérica (Motta-Aldana *et al.*, 2010; Serrano-Serrano *et al.*, 2010; Fofana *et al.*, 2001; Kaplan y Lynch, 1999; Lioi *et al.*, 1998; Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995). Mientras que el centro de domesticación del acervo GA ya ha sido ubicado entre Ecuador y norte de Perú (Motta-Aldana *et al.*, 2010; Caicedo *et al.*, 1999; Maquet *et al.*, 1999; Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995), encontrar el centro de domesticación en los dos acervos mesoamericanos (MI y MII) ha sido más complicado debido a la amplia distribución geográfica que presentan tanto sus formas silvestres como domesticadas y a la carencia de colectas de material silvestre en muchas

de sus áreas de distribución natural. Pese a estas limitaciones, se considera que estos acervos fueron domesticados en alguna región de Mesoamérica (Serrano-Serrano *et al.*, 2010; Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995; Debouck *et al.*, 1987). De forma más específica, algunos autores han señalado que el centro de domesticación podría estar localizado entre México (Istmo de Tehuantepec) o Guatemala (Fofana *et al.*, 2001; Maquet *et al.*, 1997; Lioi, 1996; Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995). Estudios moleculares recientes han señalado al centro-occidente y nor-occidente de México como el área probable de domesticación para MI (Andueza-Noh *et al.*, 2012; Chacón *et al.*, 2012; Serrano-Serrano *et al.*, 2012; Motta-Aldana *et al.*, 2010) e incluso, se ha señalado la existencia de un posible evento de domesticación que involucra al acervo MII, el cual estaría ubicado en el área de Guatemala-Costa Rica (Andueza-Noh *et al.*, 2012).

En el frijol Lima, los estudios realizados sobre su domesticación se han basado principalmente en el uso de marcadores bioquímicos como las *faseolinas* (Lioi, 1996; Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995; Esquivel *et al.*, 1992), marcadores moleculares como los RAPDs (Fofana *et al.*, 1997), y secuencias de ADN nuclear y de cloroplasto (Andueza-Noh *et al.*, 2012; Serrano-Serrano *et al.*, 2012; Motta-Aldana *et al.*, 2010). Sin embargo, para el caso del acervo GM, la información obtenida hasta ahora con este tipo de marcadores ha señalado regiones geográficas muy amplias como posibles áreas de domesticación. Es necesario usar otros enfoques y métodos de análisis que generen información complementaria sobre la domesticación de este acervo. Uno de estos enfoques es el uso de marcadores microsatélites (SSR) para analizar las relaciones genéticas entre las poblaciones silvestres y domesticadas del frijol Lima. Este enfoque ya ha sido usado en otros trabajos que han abordado la domesticación de especies como el maíz (*Zea mays* subsp. *mays*; Matsuoka *et al.*, 2002), la uva (*Vitis vinífera* subsp. *sativa*; Grassi *et al.*, 2003), la cebada (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*; Orabi *et al.*, 2007), el girasol (*Helianthus annuus*; Bye *et al.*, 2009) y el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) (Angioi *et al.*, 2010; Kwak *et al.*, 2009).

Para el acervo génico mesoamericano del frijol Lima los estudios realizados sobre diversidad, estructura y relaciones genéticas usando marcadores moleculares son escasos y solamente han analizado un pequeño número de poblaciones (entre 24 y 76) o han sido dirigidos a regiones geográficas pequeñas (Camacho-Pérez, 2012; Castiñeiras *et*

al., 2007; Martínez-Castillo *et al.*, 2007; 2006; Baudoin *et al.*, 2004; Zoro Bi *et al.*, 2003; Fofana *et al.*, 2001). De entre estos estudios, uno de los marcadores moleculares que han mostrado su eficiencia en determinar las relaciones genéticas de *P. lunatus* son los microsatélites (SSR, Simple Sequence Repeats). Éstas son regiones de nucleótidos cortas repetidas en tándem (Powell *et al.*, 1996). Estos marcadores han llegado a ser una herramienta poderosa debido a su naturaleza de locus específico, altos niveles de polimorfismo, su abundancia en el genoma, su relativa facilidad con que es registrada su variación y a su modo de herencia codominante (Blair *et al.*, 2009; Gaitán-Solís *et al.*, 2002;). Tales características hacen a estos marcadores particularmente adecuados para estudios ecológicos, evolutivos y de diversidad genética (Orabi *et al.*, 2007; Blair *et al.*, 2006; Matus y Hayes, 2002; Olsen y Schaal, 2001; Morgante y Olivery, 1993). Considerando el vacío de información aún existente sobre la domesticación del acervo génico mesoamericano del frijol Lima, el objetivo de este trabajo fue analizar las relaciones genéticas entre las poblaciones silvestres y domesticadas de este acervo y su implicación sobre su domesticación, mediante el uso de marcadores SSR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección del material vegetal

Se analizaron 91 accesiones silvestres y 59 domesticadas del acervo génico mesoamericano del frijol Lima (*Phaseolus lunatus*) colectadas a lo largo y ancho de su área de distribución natural, abarcando un total de 15 países (Anexo 2). Para la selección del material vegetal se tomó en cuenta el patrón electroforético de proteína de semilla (Lioi *et al.*, 1999; Maquet *et al.*, 1997; Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995). El material vegetal fue obtenido a partir de: 1) la colección base mundial del CIAT-Colombia, 2) la colección del Dr. Jorge Acosta (INIFAP-Celaya), 3) la colección del Dr. Rogelio Lépiz (U de G), 4) la colección del Dr. Jaime Martínez (CICY-Mérida), y 5) se realizaron 4 colectas *in situ* en áreas de México y Guatemala logrando coleccionar un total de 95 accesiones de las cuales se incluyeron al estudio 65 nuevas accesiones representativas de regiones geográficas que no han sido incluidas en estudios anteriores.

Extracción de ADN

Para la extracción del ADN se sembraron cinco semillas por accesión en el invernadero del CICY. Una vez germinadas y habiéndose obtenido plántulas, el ADN genómico se obtuvo de hojas jóvenes trifoliadas siguiendo el método CTAB (Doyle y Doyle, 1987).

Amplificación de microsatélites y electroforesis

La técnica de microsatélite fue aplicada de acuerdo con Gaitán-Solís *et al.* (2002) usando diez pares de cebadores reportados como polimórficos, los cuales han probado su utilidad en *Phaseolus lunatus* por Martínez-Castillo *et al.* (2007; 2006) (Cuadro 7). La amplificación de los fragmentos se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 sequencer (Applied Biosystem, Foster City, USA). Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 20 µL, conteniendo 1 µL de ADN genómico (20ng), 2 µL de buffer de PCR 1X, 0.4 µL de DNTPs, 1 µL de cada primer forward y reverse (0.1 µM), 0.8 µL de MgCl₂ (2mM) y 0.2 µL de Taq DNA polimerasa (1 U). Los perfiles de temperatura consistieron en un paso inicial de desnaturalización de 2 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 15 s, una temperatura de alineamiento entre 50 – 55 °C dependiendo del primer (Cuadro 7) por 15 s y una extensión final a 72 °C por 15 s. Un volumen de 5 µL de formamida, conteniendo 0.45 % de bromophenol azul y 0.25 % de xilen-cianol se agregó al producto de la PCR y fue desnaturalizado por un período de 5 min a 94 °C. 5 µL de la reacción fueron cargados en geles de poliacrilamida al 5% (19:1 acrilamida-bisacrilamida) con 5 M de urea y buffer TBE 0.5x. La electroforesis se desarrolló en una fuente de poder a 1,600 volts constante durante un tiempo de una 1 h. 45 min. (SQ3 Hoeffer sequencer). Los productos de la amplificación fueron visualizados con la técnica de tinción de plata.

Cuadro 7. Características de los diez pares de iniciadores microsatélite amplificados con la técnica de PCR, utilizados en el estudio.

Nombre	Secuencia	5' a 3'	Secuencia primer	T _m (°C)	Tamaño pb
GATS91	(GA) ₁₇	Sentido Contrasentido	GAGTGCGGAAGCGAGTAGAG TCCGTGTTCTCTGTCTGTG	53	229
AG1	(GA) ₈ GGT A(GA) ₅	Sentido Contrasentido	CATGCAGAGGAAGCAGAGTG GAGCGTCGTCGTTTCGAT	52	132
BM140	(GA) ₃₀	Sentido Contrasentido	TGCACAACACACATTTAGTGAC CCTACCAAGATTGATTTATGGG	55	190
BM156	(CT) ₃₂	Sentido Contrasentido	CTTGTTCCACCTCCCATCATAGC TGCTTGCATCTCAGCCAGAATC	52	267
BM211	(CT) ₁₆	Sentido Contrasentido	ATACCCACATGCACAAGTTTGG CCACCATGTGCTCATGAAGAT	52	186
BM154	(CT) ₁₇	Sentido Contrasentido	TCTTGCGACCGAGCTTCTCC CTGAATCTAGGAACGATGACCA G	50	218
BM170	(CT) ₅ CCTT (CT) ₁₂	Sentido Contrasentido	AGCCAGGTGCAAGACCTTAG AGATAGGGAGCTGGTGGTAGC	50	179
BM143	(GA) ₃₅	Sentido Contrasentido	GGGAAATGAACAGAGGAAA ATGTTGGGAACTTTTAGTGTG	55	143
BM164	(GT) ₉ (GA) ₂ 1	Sentido Contrasentido	CCACCACAAGGAGAAGCAAC ACCATTCAAGCCGATACTCC	52	186
BM197	(GT) ₈	Sentido Contrasentido	TGGACTGGTCGATACGAAGC CCCAGAAGATTGAGAACACCAC	54	201

T_m = Temperatura de alineamiento, Pb = pares de bases**Análisis de datos***Relaciones y estructura genética del acervo génico mesoamericano de P. lunatus*

Para analizar las relaciones genéticas entre las accesiones silvestres y domesticadas se construyeron dos dendogramas con el procedimiento del algoritmo UPGMA. Para la construcción de los dendogramas se utilizaron las matrices de distancias genéticas de Cavalli-Sforza y Edwards Dc (1967) y la distancia genética estándar de Nei para varios loci (Nei 1972). La distancia Dc asume que la diferenciación entre las poblaciones es debida únicamente a la deriva genética al azar, no asume ningún modelo de mutación para la

evolución de los microsatélites y está libre del supuesto de cuello de botella (Kwak y Gepts, 2009; Olsen y Schaal, 2001). La distancia genética estandar de Nei fue elegida ya que ésta asume tanto procesos de deriva génica como de mutación. Ambas distancias han demostrado ser apropiadas en estudios de domesticación y diversidad genética (Kwak *et al.*, 2009; Orabi *et al.*, 2007; Martínez-Castillo *et al.*, 2006; Grassi *et al.*, 2003; Olsen y Schaal, 2001). Éstos análisis se hicieron a nivel de accesiones con el programa POPULATIONS versión 1.2.28 (Langella, 2002). Los dendogramas fueron visualizados y editados con el programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011). El dendograma que presentó la mejor topología fue elegido para su análisis. Posteriormente, se realizó un análisis de coordenadas principales, técnica multivariada que permite encontrar y trazar los patrones dominantes en un conjunto de datos a partir de coordenadas principales con el programa GenALEx 6 (Peakall y Smouse, 2006). Este análisis ha demostrado su utilidad en el estudio de la domesticación en otras especies (Kwak *et al.*, 2009; Kwak y Gepts, 2009). Para conocer la distribución geográfica de las accesiones estudiadas se construyó un mapa georeferenciado con las coordenadas geográficas del lugar de colecta de cada población con el programa DIVA GIS (Hijmans *et al.*, 2001).

La estructura genética se evaluó mediante dos métodos, (1) usando el estadístico F_{ST} (Weir y Cockerham, 1984) medida en tres niveles jerárquicos: a) a nivel de acervo génico (entre todas las accesiones estudiadas), b) dentro y entre los grupos encontrados (MI y MII) y c) entre accesiones silvestres y domesticadas de MI y MII respectivamente, y (2) mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA) medida en dos niveles jerárquicos, a nivel de acervo génico (entre todas las accesiones) y a nivel de grupos (entre MI y MII) con los programas POPGENE versión 1.31 (Yeh *et al.* 1999) y ARLEQUIN ver 3.5.1 (Excoffier *et al.*, 2005) respectivamente. F_{ST} fue elegido ya que bajo condiciones de tamaño de muestra pequeño ($n \leq 10$) y pocos loci (< 20) se ha demostrado que es un estimador de diferenciación genética más conservador que R_{ST} (Gaggiotti *et al.*, 1999). Para analizar si los resultados encontrados son consecuencia de un origen común y no de flujo genético silvestre-domesticado posterior a la domesticación, también se evaluó el flujo génico histórico (Nm) con el programa POPGENE versión 1.31 (Yeh *et al.*, 1999).

Diversidad genética y efecto fundador en el acervo génico mesoamericano del frijol Lima (*P. lunatus*)

La diversidad genética fue evaluada a dos niveles: a) a nivel de acervo génico y b) a nivel de grupos. Para esto, se evaluó el polimorfismo genético calculando el porcentaje de loci polimórficos (%P), el número de alelos por locus (A), número de alelos observados (na), número de alelos efectivos (ne), índice de Shanon (I), heterosigocidad observada (H_o) y la heterosigocidad esperada (H_e). Para determinar la posible existencia de un efecto fundador, la diversidad genética de las accesiones silvestres y domesticadas fue medida y comparada entre los grupos observados con el programa POPGENE versión 1.31 (Yeh *et al.*, 1999).

RESULTADOS

Relaciones genéticas del acervo génico mesoamericano de *Phaseolus lunatus*

El dendograma obtenido con el método del algoritmo UPGMA, usando la distancia genética estándar de Nei (1972), indicó la existencia de dos grupos principales dentro del acervo génico mesoamericano (Figura 8), los cuales fueron nombrados MI y MII con base en las topologías observadas en estudios anteriores (Andueza-Noh *et al.*, 2012; Serrano-Serrano *et al.*, 2012; Motta-Aldana *et al.*, 2010; Serrano-Serrano *et al.*, 2010). El grupo MI se integró por 60 accesiones, de las cuales 36 son silvestres y 24 domesticadas. Al interior de MI se observaron tres subgrupos (A, B y C) que presentaron un patrón de agrupamiento basado en su distribución geográfica: un subgrupo grande (B) integrado principalmente por accesiones silvestres (28) y domesticadas de México (14); y dos subgrupos menores (A y C) integrados por 10 accesiones domesticadas de Centro-Sur américa y siete accesiones silvestres de México y Centro América, respectivamente. El grupo MII quedó integrado por 90 accesiones, de las cuales 53 son silvestres y 37 domesticadas (Figura 8). Dentro de MII se observaron tres subgrupos (D, E y F) de tamaño similar: el subgrupo D integrado principalmente de accesiones domesticadas (31) provenientes del Caribe, Centro y Suramérica, así como de seis accesiones silvestres de México y Centro América; el subgrupo (E) integrado sólo por accesiones silvestres de México y Guatemala (11 y 6, respectivamente) y seis accesiones domesticadas de

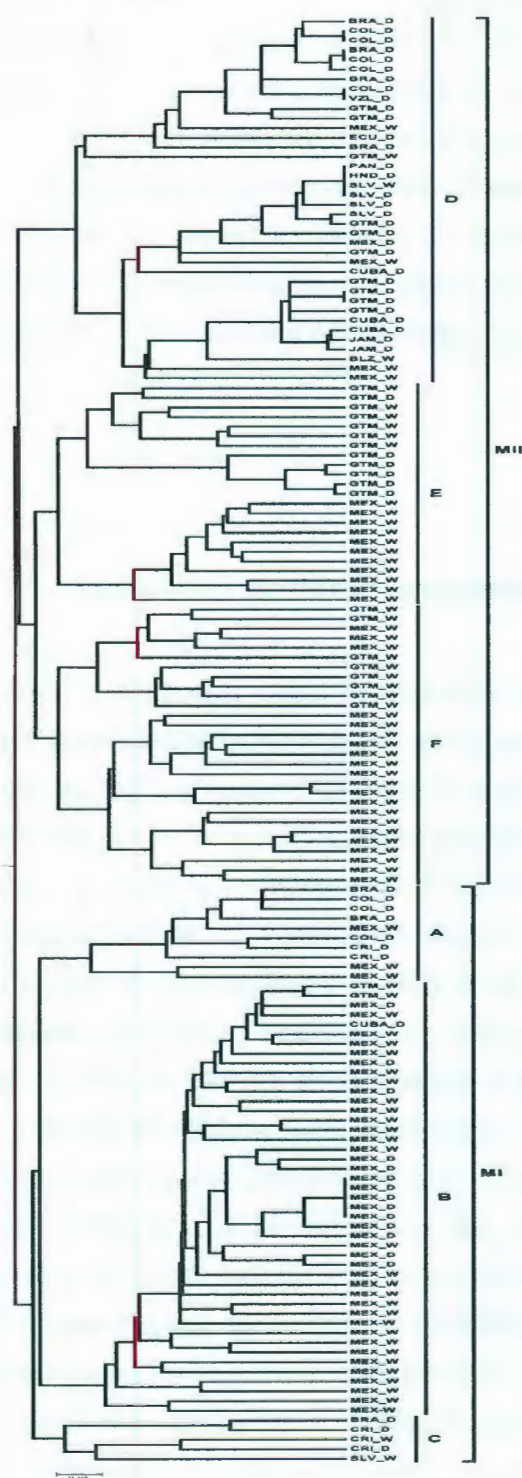


Figura 8. Relaciones genéticas entre 150 poblaciones silvestres y domesticadas del acervo génico mesoamericano del frijol Lima. Las etiquetas indican la región de colecta y el estado biológico de la muestra: MEX. México; GTM. Guatemala; BLZ. Belice; SLV. El Salvador; JAM. Jamaica; HND. Honduras; CRI. Costa Rica; PAN. Panamá; VNZ. Venezuela; COL. Colombia; ECU. Ecuador; BRA. Brasil. W silvestre; D domesticado.

El dendograma obtenido con la distancia genética de la cuerda (Dc) (datos no mostrados), señaló una topología muy similar a la observada con el UPGMA obtenido con la distancia genética de Nei (1972), formándose también dos grupos bien definidos e integrados por la misma cantidad de accesiones silvestres y domesticadas.

Asimismo los resultados obtenidos con el PCoA (Figura 9) mostraron un patrón de agrupamiento similar al UPGMA. Con éste análisis, la distribución de las accesiones en dos dimensiones claramente revela la conformación de dos grupos y debido a que las accesiones dentro de cada grupo son las mismas accesiones (con algunas excepciones) observadas en los grupos (MI y MII) del UPGMA, estos grupos también fueron llamados MI y MII. El grupo MI presentó una alta dispersión de los datos y se encontró ubicado hacia el lado izquierdo del gráfico. Éste quedó conformado por un total de 52 accesiones, de las cuales 11 son domesticadas de Centro y Suramérica, y 41 silvestres mayormente localizadas en México y Guatemala. El grupo MII presentó una distribución más compacta y se ubicó hacia el lado derecho del gráfico, éste consistió de 98 accesiones, de las cuales 48 son domesticadas colectadas en México, el Caribe, Centro y Suramérica, y 50 silvestres localizadas principalmente en México. Ambos grupos fueron separados por el eje principal uno (PCoA 1), el cual representa el 20% de la variación total. Como se mencionó anteriormente, con algunas excepciones, el patrón de agrupamiento observado en el PCoA (Figura 9) fue similar al observado en el UPGMA (Figura 8). Entre las excepciones estuvieron 13 accesiones domesticadas de México, Centro y Suramérica que se ubicaron en el grupo MI del UPGMA y que quedaron dentro del grupo MII del PCoA, y 8 accesiones silvestres de México y Guatemala que se agruparon en MII del UPGMA y que quedaron dentro del grupo MI del PCoA.

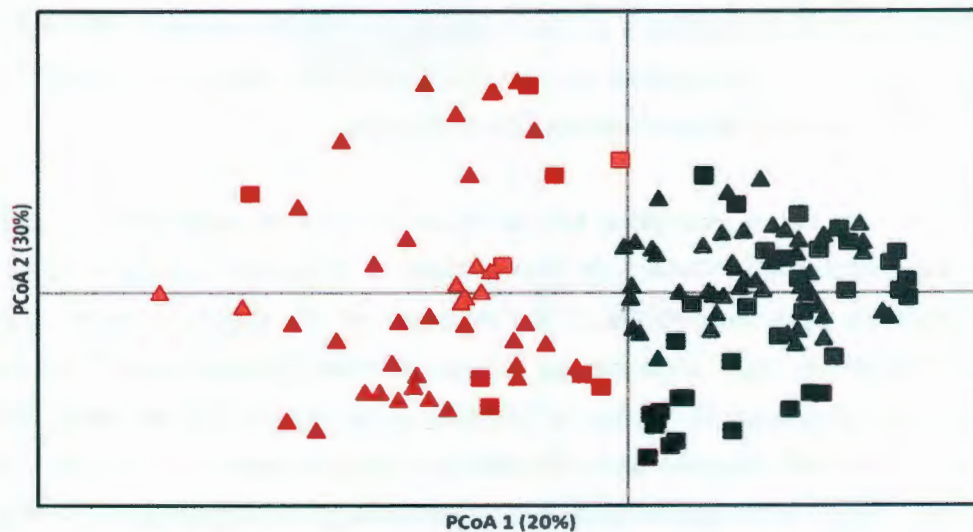


Figura 9. Análisis de coordenadas principales entre poblaciones silvestres y domesticadas del acervo génico mesoamericano del frijol Lima. ▲Silvestres del grupo MI; ■ Domesticadas del grupo MI; ▲Silvestres del grupo MII; ■ Domesticadas del grupo MII.

Distribución geográfica de las accesiones silvestres y domesticadas del acervo génico mesoamericano del frijol lima

Los grupos observados en el UPGMA y PCoA (Figuras 8 y 9) poseen una distribución geográfica bien definida (Figura 10), lo cual apoya su existencia. Las accesiones silvestres que quedaron dentro del grupo MI observado en el UPGMA y el PCoA, las encontramos distribuidas principalmente en el nor-occidente y sur-occidente de México (en los estados de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Guerrero y norte de Oaxaca), observándose sólo tres accesiones silvestres en Centro América: una en Guatemala, una en Costa Rica y una en El Salvador. Las accesiones domesticadas pertenecientes a MI las encontramos distribuidas principalmente en el sur de México (en los estados de Oaxaca, Chiapas y Península de Yucatán), Guatemala, Costa Rica, Panamá, Colombia y Brasil (Figura 3).

En el grupo MII, las accesiones silvestres presentaron un rango de distribución geográfica que incluye, principalmente, desde el nor-orient y sur de México (Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Istmo de Tehuantepec y Península de Yucatán) y el área de Guatemala observándose una sola accesión silvestre en El Salvador y otra en Belice

(Figuras 8 y 10). Por su parte, las accesiones domesticadas del grupo MII presentan un rango de distribución geográfica más amplio, localizándose principalmente en Guatemala y en menor frecuencia en El Salvador, Cuba, Jamaica, Honduras, Panamá, Venezuela, Colombia, Ecuador y Brasil (Figura 10).

Estructura genética en el acervo génico mesoamericano del frijol Lima

Los resultados de diferenciación genética a nivel de acervo génico y dentro de los grupos MI y MII fueron muy altos (a nivel de acervo: $F_{ST} = 0.90$; a nivel de grupos: MI = 0.87 y MII = 0.91). Estos valores coincidieron con el valor obtenido en el análisis de varianza molecular (AMOVA), el cual indicó que el 90% de la variación total a nivel de acervo génico se encontró entre las poblaciones dentro de los grupos. Al interior de los grupos (MI y MII) los valores de F_{ST} fueron muy similares y más altos para las accesiones domesticadas en comparación a las accesiones silvestres en ambos grupos, con valores de $F_{ST} = 0.94$ y $F_{ST} = 0.81$ para las accesiones domesticadas y silvestres del grupo MI y valores de $F_{ST} = 0.91$ y $F_{ST} = 0.88$ para las accesiones domesticadas y silvestres de MII respectivamente. Sin embargo, cuando se analizó la diferenciación genética entre MI y MII, el valor de F_{ST} fue muy bajo ($F_{ST} = 0.05$), aún cuando el AMOVA mostró que un 30% de la variación total se encuentra entre estos dos grupos con un valor $P < 0.001$.

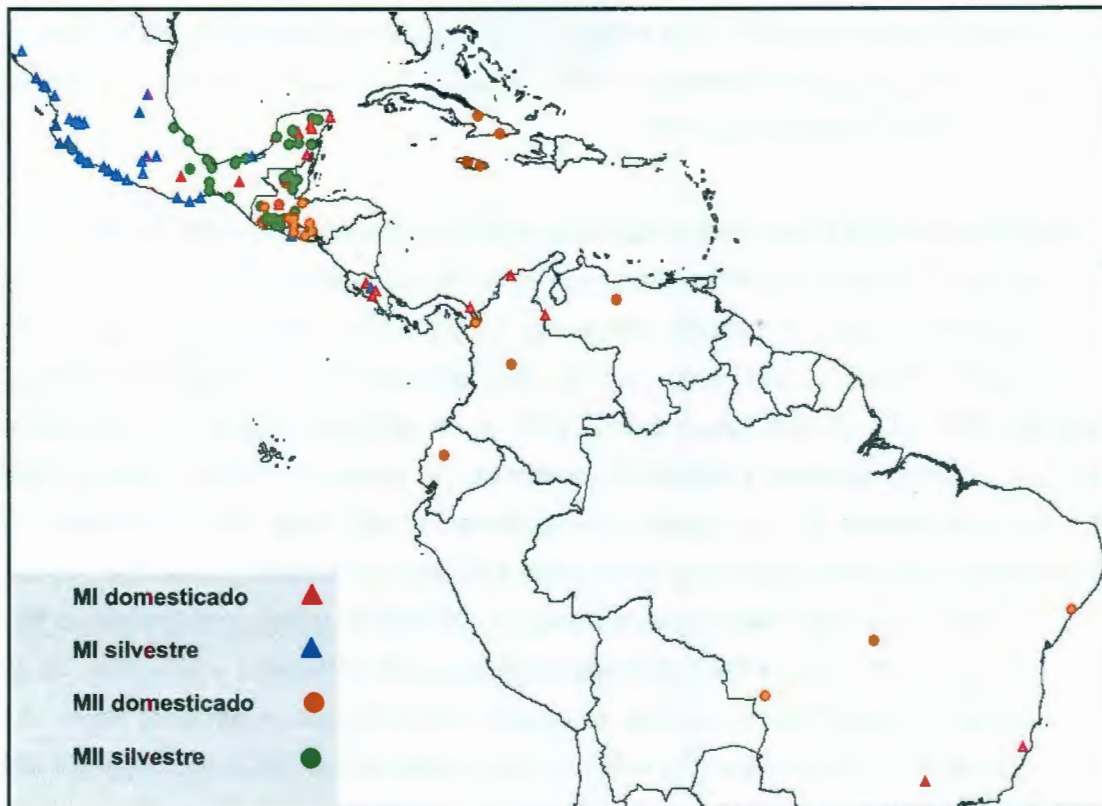


Figura 10. Mapa de distribución geográfica de los grupos observados al interior del acervo génico mesoamericano del frijol Lima usando marcadores SSRs. Las etiquetas MI y MII silvestre y domesticado, hacen referencia a los grupos observados en el PCoA y UPGMA.

Diversidad genética en el acervo génico mesoamericano del frijol Lima

A nivel de acervo génico se encontraron 93 alelos en los diez loci estudiados, con un promedio de 9.3 alelos por locus. Los loci con el mayor número de alelos fueron el BM140, BM154 y BM211 con 12 alelos. Los loci BM156 y BM197 presentaron el menor número de alelos con seis. Los valores de riqueza alélica y diversidad genética a nivel total fueron altos (Cuadro 8). A nivel de grupos también se observaron valores altos de riqueza alélica y diversidad genética. MI presentó valores menores de riqueza alélica y diversidad genética en comparación a los valores obtenidos en MII. En todos los casos el valor de F_{IS} fue positivo y H_o fue menor que H_e (Cuadro 8).

Cuadro 8. Resultados de riqueza alélica y diversidad genética a nivel de acervo génico y grupos observados en el acervo génico mesoamericano del frijol Lima, mediante 10 loci de microsatélites.

Nivel	Num. de individuos	%P	na	ne	I	He	Ho	F_{IS}
MI	60	100	7.20	2.90	1.19	0.54	0.03	0.43
MII	90	100	7.80	3.61	1.45	0.67	0.04	0.28
Acervo génico Total	150	100	9.20	3.58	1.46	0.66	0.04	0.35

%P = Porcentaje de loci polimórficos; na = Número de alelos observados; ne = Número de alelos efectivos; I = Índice de Shanon; He = Heterocigosidad esperada; Ho = Heterocigosidad observada; F_{IS} = Coeficiente de endogamia.

El análisis realizado tomando en cuenta la variedad botánica (silvestre y domesticada) de las accesiones mostró un mayor número de alelos en las accesiones silvestres que en las domesticadas, con un total de 84 y 62 alelos, respectivamente. A nivel de cada locus también se observó que las accesiones silvestres presentaron un mayor número de alelos en comparación a las accesiones domesticadas con un promedio de 8.4 y 6.2 alelos por locus, respectivamente, siendo los alelos de las accesiones domesticadas un subconjunto de los alelos observados en las accesiones silvestres. De igual manera, las accesiones silvestres presentaron los valores mayores de riqueza alélica y diversidad genética (Cuadro 9). La reducción en diversidad genética (efecto fundador), fue calculada al comparar la diversidad total obtenida con las accesiones silvestres entre la diversidad total de las accesiones domesticadas. Los resultados indicaron una reducción del 19% en diversidad genética dentro del acervo génico mesoamericano del frijol Lima. Los valores de F_{IS} fueron positivos tanto en las accesiones silvestres como en las domesticadas siendo mayor en las últimas y Ho fue menor que He

Cuadro 9. Estimadores de diversidad genética en las poblaciones silvestres y domesticadas del acervo génico mesoamericano del frijol Lima, usando 10 loci de microsatélites.

Variedad botánica	Num. de individuos	%P	na	ne	I	He	Ho	F_{IS}
Total cultivadas	59	100	6.00	2.58	1.13	0.55	0.009	0.50
Total silvestres	91	100	8.40	4.01	1.49	0.68	0.06	0.33

%P = Porcentaje de loci polimórficos; na = Número de alelos observados; ne = Número de alelos esperados; I = Índice de Shanon; He = Heterocigosidad esperada; Ho = Heterocigosidad observada; F_{IS} = Coeficiente de endogamia.

DISCUSIÓN

Los marcadores SSR han sido una herramienta útil para estudiar el origen, evolución y domesticación de diferentes cultivos como el maíz (*Zea mays*; Matsuoka *et al.*, 2002), frijol (*Phaseolus vulgaris*; Kwak *et al.*, 2009), calabaza (*Cucurbita pepo* L.; Gong *et al.*, 2011), uva (*Vitis vinífera* subsp. *sativa* L.; Grassi *et al.*, 2003), cebada (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* L.; Orabi *et al.*, 2007) y yuca (*Manihot esculenta* subsp. *esculenta* Crantz.; Olsen y Schaal, 2001), entre otros. Debido a que actualmente el tema de la domesticación de los acervos génicos mesoamericanos del frijol Lima (MI y MII) sigue en debate (Andueza-Noh *et al.*, 2012; Chacón *et al.*, 2012; Serrano-Serrano *et al.*, 2012; Motta-Aldana *et al.*, 2010), en este trabajo los marcadores SSR fueron usados por primera vez para aportar evidencias sobre este tema a través del análisis de las relaciones genéticas entre las accesiones silvestres y domesticadas de un gran número de colectas de *P. lunatus* obtenidas a lo largo y ancho del área de distribución natural de la especie.

Relaciones genéticas entre accesiones silvestres y domesticadas del acervo génico mesoamericano del frijol Lima

Considerando las relaciones genéticas entre las poblaciones silvestres y domesticadas del frijol Lima observadas en este estudio (Figuras. 8, 9 y 10), se confirmó la existencia de dos principales grupos (MI y MII), ambos conteniendo tanto accesiones silvestres como domesticadas. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con lo reportado recientemente por Serrano-Serrano *et al.* (2010) quienes reportaron por primera vez la formación de dos grupos bien definidos, genética y geográficamente, al interior del acervo GM del frijol Lima. Además, estos resultados dan soporte a lo publicado recientemente por Andueza-Noh *et al.* (2012) y concuerdan también con lo reportado por otros autores que utilizaron evidencia de ADN de cloroplasto e ITS (Serrano-Serrano *et al.*, 2012; Motta-Aldana *et al.*, 2010). Hasta el año 2010, los estudios publicados sobre la diversidad genética y domesticación del frijol Lima únicamente reportaban, aparte del acervo génico andino, la existencia de solo otro acervo al que llamaron acervo génico mesoamericano (Fofana *et al.*, 2001; Caicedo *et al.*, 1999; Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995). El hallazgo reciente de MI y MII puede ser debido a que en este trabajo, al igual que en los estudios realizados después del 2010, se incluyó un mayor número de accesiones, muchas de éstas siendo nuevas colectas obtenidas principalmente en el área del norte y centro occidente de México, costa del Golfo de México y el departamento del Petén en Guatemala, en comparación a las accesiones analizadas en los estudios previos, las cuales provinieron principalmente de América Central y Suramérica. Otro aspecto que pudo haber permitido diferenciar los grupos MI y MII en este estudio, es el marcador utilizado, el cual ha demostrado ser más polimórfico en comparación a los marcadores dominantes utilizados en los estudios previos al 2010 (Proteína de semilla, AFLP y sondas de ADNcp; Belaj *et al.*, 2003; Pejic *et al.*, 1998). Un escenario similar al encontrado en este estudio ha sido observado en el acervo génico mesoamericano del frijol común (*Phaseolus vulgaris*), especie cercana del frijol Lima, donde han sido identificados dos grupos genéticos usando también marcadores SSR (Kwak *et al.*, 2009; Kwak y Gepts, 2009).

Los altos valores de diferenciación genética obtenidos a nivel de acervo génico y a nivel de grupos MI y MII ($F_{ST} = 0.90, 0.87$ y 0.91 respectivamente), concuerdan con el valor obtenido en el AMOVA (90%) y nos permiten observar una alta diferenciación genética entre las accesiones al interior de cada grupo. Los valores de F_{ST} son superiores a los valores de N_{ST} (un estimador de diferenciación genética análogo a F_{ST} utilizado para hacer comparaciones con otros estudios cuando se trabaja con secuencias de ADN) y F_{ST} reportados por Serrano-Serrano *et al.* (2010) y Zoro Bi *et al.* (2003) en poblaciones silvestres del frijol Lima. El alto grado de diferenciación genética observado a nivel de grupos es consistente con el sistema reproductivo de la planta, la cual es principalmente autógama y con una limitada habilidad de dispersión de polen y semillas, la cual no excede un radio de seis metros, como ha sido reportado en poblaciones de Costa Rica (Baudoin *et al.*, 2004). Ésto puede permitir el aislamiento por distancia (Serrano-Serrano *et al.*, 2010), además los valores de F_{IS} y H_o indicaron un exceso de individuos homocigos dando mayor soporte a los resultados de diferenciación genética. Estos resultados también son comparables a lo reportado por otros autores que han analizado tanto poblaciones silvestres como domesticadas del frijol Lima (Andueza-Noh *et al.*, 2012) y son superiores a lo reportado en frijol común (Nanni *et al.*, 2011; Kwak y Gepts, 2009; Chacón *et al.*, 2007).

Por otro lado, dentro de los grupos MI y MII las accesiones domesticadas presentaron mayor diferenciación genética en comparación a las accesiones silvestres. Un factor que pudo haber generado un mayor valor de F_{ST} en las accesiones domesticadas dentro de MI y MII, son los cambios en los sistemas agrícolas tradicionales lo que ha provocado una reducción en el número y densidad de poblaciones sembradas por los agricultores, así como por la preferencia del mercado hacia unas cuantas variedades domesticadas. Esto último provoca que los agricultores no mezclen sus variedades en los campos de cultivo, ejerciendo así un probable aislamiento por distancia entre sus variedades de frijol Lima, como ha sido observado para la Península de Yucatán (Martínez-Castillo, 2005).

A pesar de que el valor de F_{ST} observado entre los dos grupos MI y MII fue bajo ($F_{ST} = 0.05$, indicativo de una baja diferenciación genética), el AMOVA indicó un alto grado de diferenciación genética entre MI y MII (30%) con un alto valor de significancia

estadística ($P < 0.001$) siendo una evidencia más de la existencia de éstos grupos. Un aspecto que pudo influir en el bajo valor de F_{ST} observado entre los grupos MI y MII, es el hecho de que ambos grupos divergieron recientemente, como ha sido propuesto por Serrano-Serrano *et al.* (2010). El valor de F_{ST} observado entre MI y MII es comparable al observado por Barrantes *et al.* (2008). Estos autores evaluaron poblaciones silvestres de *P. lunatus* de Costa Rica y argumentaron que los procesos de extinción-recolonización pueden aumentar o reducir el efecto de la diferenciación genética entre las poblaciones como resultado de un mayor o menor flujo génico. Esto concuerda con los resultados observados aquí, ya que el valor de flujo génico observado fue alto ($Nm = 3.9$), lo que pudo favorecer una diferenciación menor entre accesiones de los grupos. El valor de F_{ST} encontrado entre los grupos en este trabajo es superior al $F_{ST}=0.023$ reportado por Londoño (2011) al evaluar 202 poblaciones del acervo génico mesoamericano y andino del frijol común (*P. vulgaris* L.). Por otro lado, los resultados del AMOVA entre MI y MII son similares a los reportados en estudios anteriores del frijol Lima (Serrano-Serrano *et al.*, 2010; Fofana *et al.*, 1997). Además del alto valor de diferenciación genética observado en el AMOVA, los resultados obtenidos por Andueza-Noh *et al.* (2012), Serrano-Serrano *et al.* (2012), Motta-Aldana *et al.* (2010) y Serrano-Serrano *et al.* (2010), quienes reportan también la formación de dos grupos al interior del acervo GM, dan soporte a estos resultados, confirmando la existencia de los dos grupos génicos observados.

Diversidad genética y efecto fundador en el acervo génico mesoamericano del frijol Lima

El número de alelos encontrados con los 10 loci estudiados, es superior a lo reportado en otros estudios con marcadores microsatélites (Martínez-Castillo *et al.*, 2011; Martínez-Castillo *et al.*, 2006). Estas diferencias pueden deberse al número de loci y el tamaño de muestra analizado, ya que los estudios citados anteriormente fueron desarrollados a nivel regional (únicamente en la Península de Yucatán) usando 9 y 8 loci de microsatélites respectivamente y este estudio abarcó una mayor área de distribución geográfica, así como, un mayor número de accesiones. Estos resultados también son superiores a los reportados para el valle central de Costa Rica (Ouédraogo y Baudoin, 2002), quienes utilizaron SSR e isoenzimas.

Niveles altos de riqueza alélica y diversidad genética fueron observados a nivel de acervo génico y de grupos (Cuadro 8). A nivel de grupos, MII presentó los valores más altos de riqueza y diversidad genética, esto puede ser resultado del mayor número de accesiones que se incluyeron en MII ($MI = 90$, $MI = 60$) y/o ser consecuencia de un cuello de botella ocurrido durante la diferenciación de ambos grupos, considerando que MI habría divergido de MII (Serrano-Serrano *et al.*, 2010). Los altos niveles de riqueza alélica y diversidad genética encontrados en este trabajo son similares a los reportados en estudios previos que usaron marcadores de ADN de cloroplasto, ITS y SSR (Andueza-Noh *et al.*, 2012; Martínez-Castillo *et al.*, 2011; Motta-Aldana *et al.*, 2010; Serrano-Serrano *et al.*, 2010; Camacho-Pérez, 2009; Martínez-Castillo *et al.*, 2006), y superiores a los reportados en estudios previos que usaron isoenzimas (Zoro Bi *et al.*, 2003; Ouédraogo y Baudoin, 2002). Es conocido que los SSR son más polimórficos que las isoenzimas, por lo cual se espera que detecten niveles altos de variación de ADN entre genomas muy relacionados (Ouédraogo y Baudoin, 2002; Olsen y Schaal, 2001; Bowers *et al.*, 1996). Los altos niveles de diversidad genética aquí reportados pueden ser atribuidos al amplio rango de distribución geográfica abarcado en este estudio, lo que permite abarcar poblaciones creciendo en un amplio espectro de condiciones ecológicas (López-Soto *et al.*, 2005).

Los niveles de riqueza alélica y diversidad genética en las accesiones analizadas fueron, en todos los casos, mayores en las accesiones silvestres que en las domesticadas (Cuadro 9). Este resultado puede ser atribuido a que las accesiones domesticadas han estado sujetas a fuertes cuellos de botella como resultado del proceso de domesticación al que han sido sometidas (Ladizinsky, 1985). Éstos resultados concuerdan con estudios previos que han reportado reducción en la diversidad genética de las poblaciones domesticadas del frijol Lima (Andueza-Noh *et al.*, 2012; Serrano-Serrano *et al.*, 2012; Martínez-Castillo *et al.*, 2011; Motta-Aldana *et al.*, 2010). Finalmente, observamos un 19% de reducción en diversidad genética dentro del GM del frijol Lima en las poblaciones domesticadas. Resultados similares han sido reportados en otros cultivos que han sido domesticados, como es el caso del maíz (*Zea mays*), la alfalfa (*Medicago sativa* L.) y frijol común (*P. vulgaris*) con niveles de reducción en diversidad genética de 38, 31 y de 54 a 69%, respectivamente (Nanni *et al.*, 2011; Muller *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2005; Tenaillon *et al.*, 2004). Aunque menor a lo reportado en estudios anteriores (Andueza-Noh

et al. 2012; Motta-Aldana *et al.* 2010), los resultados observados en reducción de la diversidad genética, dan soporte a la existencia de un efecto fundador en el acervo génico mesoamericano del frijol Lima como resultado de su domesticación.

Implicaciones en el proceso de domesticación

La gran diversidad en tipos de semilla, la amplia distribución geográfica que presentan tanto las poblaciones silvestres como cultivadas del acervo GM del frijol Lima y el descubrimiento reciente de los acervos génicos MI y MII (Serrano-Serrano *et al.*, 2012; Martínez-Castillo *et al.*, 2004; Ballesteros, 1999), sugieren la existencia de más de un evento de domesticación al interior del acervo GM. En particular, los resultados confirmaron la existencia de los dos grupos (MI y MII), cada grupo conformado tanto por accesiones silvestres como cultivadas y con un rango geográfico bien definido. Éste resultado sugiere la existencia de al menos dos eventos de domesticación independientes en el acervo GM. Considerando las relaciones genéticas más cercanas entre las accesiones silvestres y domesticadas del grupo MI, el cual se distribuye en la región centro-occidente y sur occidente de México, esta región representa un posible centro de domesticación para este grupo, cuya domesticación podría haberse dado en un sitio específico ubicado en la región que abarca los actuales estados de Nayarit, Jalisco, Michoacán y Guerrero, dentro de la región biogeográfica definida como Nayarit-Guerrero por Stuart (1964). Los resultados observados aquí concuerdan con lo reportado por Andueza-Noh *et al.* (2012) quienes, utilizando marcadores de ADN de cloroplasto, proponen la misma área de domesticación para MI. Éstos resultados también apoyan lo reportado por Serrano-Serrano *et al.* (2012) quienes, utilizando marcadores ITS, propusieron la región de Nayarit-Jalisco o Guerrero-Oaxaca en el centro-occidente de México como área de domesticación de MI. Además los resultados también son consistentes con lo reportado por otros autores. Kaplan (1965) con base en evidencia arqueobotánica sugirió las costas de Guerrero y Oaxaca como área de domesticación para el frijol Lima tipo sieva. Motta-Aldana *et al.* (2010) sugirieron la región del norte y noreste del Istmo de Tehuantepec como área de domesticación de MI. Es importante mencionar que la región que se propone como área de domesticación de MI, también ha sido propuesta como centro de domesticación para otras especie de *Phaseolus*, como son el frijol común (*P. vulgaris*) y el frijol tepari (*P. acutifolius* A. Gray), con base en

marcadores microsatélites y marcadores AFLP (Blair *et al.*, 2012; Nanni *et al.*, 2011; Kwak *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2006).

Para el caso de MII, considerando las relaciones genéticas más cercanas entre las accesiones silvestres y domesticadas de este grupo, el cual se distribuye principalmente en Guatemala, este país es su área probable de domesticación. Para MII Andueza-Noh *et al.* (2012), sugirieron un área de domesticación más amplia (la región entre Guatemala, Costa Rica y El Salvador). Los resultados aquí obtenidos, se ven apoyados por lo reportado en estudios anteriores (Fofana *et al.*, 2001; Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995; Sauer, 1994), quienes han sugerido el área de Guatemala como posible centro de domesticación del frijol Lima mesoamericano.

Los resultados obtenidos en este trabajo, comparando el UPGMA y el mapa de distribución geográfica (Figuras 8 y 10), muestran que las accesiones domesticadas presentan una mayor distribución geográfica en comparación a las accesiones silvestres (en ambos grupos), indicando la existencia de dispersión post-domesticación. Como se señaló previamente, los datos de SSR sugieren al nor-occidente y centro-occidente de México como la posible área de domesticación de MI y a la región de Guatemala como el área de domesticación de MII. Sin embargo, se encontraron accesiones domesticadas de ambos grupos en áreas fuera de estas regiones, incluso en lugares muy alejados de Centroamérica y América del Sur (Figura 10). Estos resultados sugieren que, al igual que en la mayoría de los cultivos domesticados, la dispersión del frijol Lima domesticado a partir de su (s) centro (s) de domesticación dependió totalmente de las condiciones culturales del hombre precolombino, es decir, la dispersión de este cultivo siguió las rutas comerciales, de guerra o expansión de estos antiguos pobladores (Ballesteros, 1999). A partir de los resultados observados, podemos suponer que esta especie tuvo una difusión temprana similar a la reportada para el maíz, donde los ríos pasaron a formar parte importante en la dispersión del cultivo (Zizumbo Villarreal y Colunga-García Marín, 2010; Pohl *et al.*, 2007; Sluyter y Domínguez, 2006; Pohl *et al.*, 1996).

BIBLIOGRAFÍA

- Angioi, S.A., D. Rau, G. Attene, L. Nanni, E. Belluci, G. Logozzo, V. Negri, P.L. Spagnoletti y R. Papa (2010). Beans in Europe: origin and structure of the European landraces of *Phaseolus vulgaris* L. Theoretical and Applied Genetics, 121, 829-843.
- Andueza Noh, R.H., M.L. Serrano-Serrano, M.I. Chacón, I. Sánchez del-Pino, L. Camacho-Pérez, J. Coello-Coello, J.O. Mijangos-Cortés, D.G. Debouck y J. Martínez-Castillo (2012). Multiple domestications of the Mesoamerican gene pool of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.): evidence from chloroplast DNA sequences. Genetic Resources and Crop Evolution, DOI 10.1007/s10722-012-9904-9.
- Barrantes, D., G. Macaya, L. Guarino, J.P. Baudoin y O. Rocha (2008). The impact of local extinction on genetic structure of wild populations of Lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) in the Central Valley of Costa Rica: Consequences for the conservation of plant genetic resources. Biología Tropical, 56, 1023-1041.
- Ballesteros, P.G. (1999). Contribuciones al conocimiento del frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) en América tropical. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. 435 p.
- Baudoin, J.P., O. Rocha, J. Degreef, A. Maquet, L. Guarino (2004). Ecogeography, Demography, Diversity and Conservation of *Phaseolus lunatus* L. in the Central Valley of Costa Rica. Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genepools. Internacional Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 94 p.
- Baudoin, J.P. (1991). La Culture et l'Amélioration de la Légumineuse Alimentaire *Phaseolus lunatus* L. en Zonas Tropicales. Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale, Ede, Pays-Bas / Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux, Belgique. 209 p.
- Belaj, A., Z. Satovic, G. Cipriani, L. Baldoni, R. Testolin, L. Rallo y I. Trujillo (2003). Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationship in olive. Theoretical and Applied Genetics, 107, 736-744.
- Bowers, J.E., G.S. Dangi y C.P. Meredith (1999). Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. American Journal Enology and Viticulture, 50, 243-246.

- Blair, M.W., M. Muñoz, F. Pedraza, M. Giraldo, H.F. Buendia y N. Hurtado (2009). Development of microsatellite markers for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) based on screening of nonenriched, small-insert genomic libraries. *Genome*, 52, 772-782.
- Blair, M.W., M.C. Giraldo, H.F. Buendía, E. Tovar, M.C. Duque y S. Beebe (2006). Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 113, 100-109.
- Bye, R., E. Linares y D.L. Lentz (2009). México centro de origen de la domesticación del girasol. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 12, 5-12.
- Caicedo, A.L., E. Gaitán, M.C. Duque, O. Toro Chica, D.G. Debouck y J. Thome (1999). AFLP fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from South America. *Crop Science*, 39, 1497-1507.
- Camacho-Pérez, L. (2012). Diversidad, Estructura y relaciones genéticas del frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L. var. *lunatus*) en el área maya. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México. 66 p.
- Camacho-Pérez, L. (2009). Análisis de la erosión genética en variedades del lb (*Phaseolus lunatus* L.) del noreste de Campeche, México. Tesis de Licenciatura. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México. 93 p.
- Cavalli-Sforza, L.L., y A.W.F. Edwards (1967). Phylogenetic analysis models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*, 19, 233-257.
- Castiñeiras, L., F. Guzmán, M. Duque, T. Shagardsky, R. Cristobal y M. Carmen (2007). AFLPs and morphological diversity of *Phaseolus lunatus* L. in Cuban home gardens: approaches to recovering the lost ex situ collection. *Biodiversity and Conservation*, 16, 2847-2865.
- Chacón, S.M.I., J.R. Motta-Aldana, M.L. Serrano-Serrano y D.G. Debouck (2012). Domestication of Lima beans: A New Look at an Old Problem. *Biodiversity in Agriculture*. in: Domestication, Evolution and Sustainability. Gepts P. (Ed.). Cambridge University, Davis, USA. pp. 330-343.
- Chacón, M.I., B. Pickersgill, D.G. Debouck y S.J. Arias (2007). Phylogeographic analysis of the chloroplast DNA variation in wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Americas. *Plant Systematic and Evolution*, 266, 175-195.

- Delgado-Salinas, A., T. Turley, A. Richman y M. Lavin (1999). Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). Systematic Botany, 23, 438-460.
- Debouck, D.G., J.H. Liñan Jara, A. Campana Sierra y J.H. de la Cruz Rojas (1987). Observations on the domestication of *Phaseolus lunatus* L. Plant Genetic Resources Newsletter, 70, 26-32.
- Doyle, J. y J. Doyle. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19, 11-15.
- Esquivel, M., L. Castiñeira y K. Hammer (1993). The domestication of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Cuba: morphological and biochemical studies. FAO/IPGRI. Plant Genetic Resources, 92, 21-22.
- Excoffier, L., G. Laval, y S. Schneider (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online. 1, 47-50.
- Fofana, B., P. du Jardin y J.P. Baudoin (2001). Genetic diversity in the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by chloroplast DNA (cpDNA) variations. Genetic Resources and Crop Evolution, 48, 437-445.
- Fofana, B., J.P. Baudoin, X. Vekemans, D.G. Debouck y P. du Jardin (1999). Molecular evidence for an Andean origin and a secondary gene pool for the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) using chloroplast DNA. Theoretical and Applied Genetics, 98, 202-212.
- Fofana, B., X. Vekemans, E. du Jardin y J.P. Baudoin (1997). Genetic diversity in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by RAPD markers. Euphytica, 95, 157-165.
- Freytag, G.F. y D.G. Debouck (2002). Taxonomy, Distribution and Ecology of the Genus *Phaseolus* (Leguminosae-papilionoideae) in North America, Mexico and Central America. Botanical Research Institute of Texas (BRIT), Forth Worth, TX, USA. 298 p.
- Gaitán-Solís, E., M.C. Duque, K.J. Edwards y J. Tohme (2002). Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, characterization and cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. Crop Science, 42, 2128-2136.
- Gaggiotti, O.E., O. Lange, K. Rassmann y C. Gliddon (1999). A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. Molecular Ecology, 8, 1513-1520.

- Gepts, P., R. Papa, A. González Mejía, J. Acosta Gallegos y A. Delgado Salinas (1999). Human effects on *Phaseolus vulgaris* adaptation during and after domestication. In: Evolution in Man-Made Habitats. Van Raamsdonk L. and den Nijs J. (eds.) Proceedings of the VIIth IOPB symposium. Hugo de Vries Laboratory, University of Amsterdam, Amsterdam. pp.161–181.
- Grassi, F., M. Labra, S. Imazio, A. Spada, S. Sgorbati, A. Scienza y F. Sala (2003). Evidence of a secondary grain domestication centre detected by SSR analysis. Theoretical and Applied Genetics, 107, 1315-1320.
- Gutiérrez-Salgado, A, P. Gepts y D.G. Debouck (1995). Evidence for two gene pools of the Lima beans, *Phaseolus lunatus* L., in the Americas. Genetic Resources and Crop Evolution, 42, 15-28.
- Gong, L., S.H. Paris, M.H Nee, G. Stift, M. Pachner y J. Vollmann (2011). Genetic relationships and evolution in *Cucurbita pepo* (pumpkin, squash, gourd) as revealed by simple sequence repeat polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics, DOI 10.1007/s00122-011-1752-z
- Hijmans, R.J., M. Cruz, E. Rojas, y L. Guarino (2001). DIVA-GIS, version 1.4. A geographic information system for the management and analysis of genetic resources data.
- Kaplan, L. y T.F. Lynch (1999). *Phaseolus* (Fabaceae) in archaeology: AMS radiocarbon dates and their significance for pre-colombian agriculture. Economic Botany, 53, 261-272.
- Kaplan, L. (1965). Archaeology and domestication in American *Phaseolus* (beans). Economic Botany, 19, 358-368.
- Kwak, M., J. Kami y P. Gepts (2009). The putative mesoamerican center of domestication of *Phaseolus vulgaris* L. is located in the Rio Lerma-Santiago basin of Mexico. Crop Science, 49, 554-563.
- Kwak, M. y P. Gepts (2009). Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). Theoretical and Applied Genetics, 118, 979-992.
- Ladizinsky, G. (1985). Founder effect in crop-plant evolution. Economic Botany, 39, 191-199.
- Langella, O. (2002). Populations 1.2.30: a population genetic software. CNRS UPR9034. <http://www.pge.cnrs.fr/bioinfo/populations/>. [Acceso Febrero 2012].

-
- Lioi, L., C. Lotti y 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.
- Londoño, C.J.M. (2011). Estructura poblacional y diversidad genética de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en 202 genotipos por medio de SSR fluorescentes. Tesis de Licenciatura, Universidad del Quindío, Armenia, Facultad de Ciencias Básicas y Tecnológicas 93 p.
- López Soto, J.L., C.J.A. Ruiz, G.J.J. Sánchez y I.R. Lépiz (2005). Climatic adaptation of 25 wild bean species (*Phaseolus* spp) in Mexico. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28, 221-230.
- Maquet, A., X. Vekemans y J.P. Baudoin (1999). Phylogenetic study on wild allies of lima bean, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae) and implications on its origin. *Plant Systematic and Evolution*, 218, 43-54.
- Maquet, A., I. Zoro, M. Delvaux, B. Wathelet y J. P. Baudoin (1997). Genetic structure of a Lima bean base collection using allozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 980-991.
- Maquet, A. (1995). Étude de la Diversité Génétique de la Légumineuse Alimentaire *Phaseolus lunatus* L. par l'Analyse de Caracteres Morphophysiologiques et 74 de Marqueurs Protéiques. Tesis de Doctorado, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, Gembloux, Belgique. 203 p.
- Matsuoka, Y., Y. Vigouroux, M.M. Goodman, G.J. Sanchez, E. Buckler y J. Doebley (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA*, 99, 6080-6084.
- Martínez-Castillo, J., L. Camacho-Pérez, J. Coello-Coello y R.H. Andueza-Noh (2011). 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., D. Zizumbo-Villarreal, P. Gepts y P. Colunga-García Marín (2007). Gene flow and genetic structure in the wild-weedy-domesticated complex of *Phaseolus lunatus* L. in its Mesoamerican center of domestication and diversity. *Crop Science*, 47, 58-66.
-

- Martínez-Castillo, J., D. Zizumbo-Villarreal, P. Gepts, P. Delgado-Valerio y P. Colunga-García Marín (2006). Structure and genetic diversity of wild populations of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Yucatan peninsula, Mexico. *Crop Science*, 46, 1071-1080.
- Martínez-Castillo, J. (2005). Diversidad intraespecífica de *Phaseolus lunatus* L. e intensificación de la agricultura tradicional en la Península de Yucatán, México. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México. 128 p.
- Martínez-Castillo, J., D. Zizumbo-Villarreal, H. Perales-Rivera y P. Colunga-García Marín (2004). Intraspecific diversity and morpho-phenological variation in *Phaseolus lunatus* L. from the Yucatan peninsula, Mexico. *Economic Botany*, 58, 354-380.
- Matus, I.A. y P.M. Hayes (2002). Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. *Genome*, 45, 1095-1106.
- Morgante, M. y A.M. Olivieri (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3, 175-182.
- Motta-Aldana, J., M.L. Serrano-Serrano, H.J. Torres, C.G. Villamizar, D.G. Debouck y M.I. Chacón (2010). Multiple origins of Lima bean landraces in the Americas: evidence from chloroplast and nuclear DNA polymorphisms. *Crop science*, 50, 1773-1787.
- Muller, M.H., C. Poncet, J.M. Prosperi, S. Santoniand y J. Ronfort (2006). Domestication history in the *Medicago sativa* species complex: inferences from nuclear sequence polymorphism. *Molecular Ecology*, 15, 1589-1602.
- Muñoz, C.L., C.M. Duque, D.G. Debouck y W.M. Blair (2006). Taxonomy of tepary bean and wild relatives as determined by amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Crop Science*, 46, 1744-1754.
- Nanni, L, E. Bitocchi, E. Bellucci, M. Rossi, D. Rau, G. Attene, P. Gepts y R. Papa (2011). Nucleotide diversity of a genomic sequence similar to shatterproof (PvSHP1) in domesticated and wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 123, 1341-1357.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106, 283-292.
- Olsen, K.M. y B.A. Schaal (2001). Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, *Euphorbiaceae*) and its wild relatives: further evidence for a southern Amazonian origin of domestication. *American Journal of Botany*, 88, 131-142.

- Orabi, J., G. Backes, A. Wolday, A. Yahyaoui y A. Jahoor (2007). The horn of Africa as a centre of barley diversification and a potential domestication site. *Theoretical and Applied Genetics*, 114, 1117-1127.
- Ouédraogo, M. y J.P. Baudoin (2002). Comparative analysis of genetic structure and diversity in wild Lima bean populations from the Central Valley of Costa Rica, using microsatellite and isozyme markers. *Annual Report of The Bean Improvement Cooperative* 45:240-241.
- Peakall, R. y P.E. Smouse (2006). GENALEX 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295.
- Pejic I., P. Ajmone-Marsan, M. Morgante, V. Kozumplick, P. Castiglioni, G. Taramino y M. Motto (1998). Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSR and AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 1248-1255.
- Powell, W., G. Machray y J. Provan (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 1, 215-222.
- Pohl, M.E.; D.R. Piperno; K.O. Pope y J.G. Jones (2007). Microfossil evidence for precolumbian maize dispersal in the neotropics from San Andres, Tabasco, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 104, 6870-6875.
- Pohl, M.E., K.O. Pope, J.G. Jones, J.S. Jacob, D.R. Piperno, S.D. France, D.L. Lentz, J. A. Gifford, M.E. Danforth y J. K. Josserand (1996). Early agriculture in the Maya Lowlands. *Latin America. Antiquity*, 7, 355-372.
- Sauer, D.J. (1994). *Historical Geography of Crop Plants*. CRC press, Los Angeles, CA. 309 p.
- Serrano-Serrano, M.L., R.H. Andueza-Noh, J. Martínez-Castillo, D.G. Debouck y M.I. Chacón (2012). Evolution and domestication of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Mexico: Evidence from ribosomal DNA. *Crop Science*, 52, 1698-1712.
- Serrano-Serrano, M.L., J. Hernandez-Torres, G. Castillo-Villamizar, D.G. Debouck y M.I. Chacón (2010). Gene pools in wild Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Americas: Evidences for an Andean origin and past migrations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54, 76-87.
- Sluyter, A. y G. Domínguez (2006). Early maize (*Zea mays* L.) cultivation in Mexico: dating sedimentary pollen records and its implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 1147-1151.

- Stuart, L.C. (1964). Fauna of Middle America, in: Handbook of Middle American Indians West, R.C. (ed.). 1, 316-363.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei y S. Kumar (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.
- Tenaillon, M.I., J. U'Ren, O. Tenaillon y B.S. Gaut (2004). Selection versus demography: a multilocus investigation of the domestication process in maize. *Molecular Biology and Evolution*, 21, 1214-1225.
- Weir, B.S. y C.C. Cockerham (1984). Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.
- Wright, S.I., I.V. Bi, S.G. Schroeder, M. Yamasaki, J.F. Doebley, M.D. McMullen y B.S. Gaut (2005). The effects of artificial selection on the maize genome. *Science*, 308, 1310-1314.
- Yeh, F.C. y T.J.B. Boyle (1999). Popgene v. 1.31. Microsoft Windows-based freeware for population analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Edmonton
- Zizumbo-Villarreal, D. y P. Colunga-García Marín (2010). Origin of agriculture and plant domestication in west Mesoamerica. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57, 813-825.
- Zizumbo-Villarreal, D., P. Colunga-García Marín, E. Payró de la Cruz, P. Delgado-Valerio y P. Gepts (2005). Population structure and evolutionary dynamics of wild-weedy-domesticated complexes of common bean in a Mesoamerican region. *Crop Science*, 45, 1073-1083.
- Zoro Bi, I., A. Maquet, J.P. Baudoin (2003). Population genetic structure of wild *Phaseolus lunatus* (Fabaceae), with special reference to population sizes. *American Journal of Botany*, 90, 897-904.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

Elección de los marcadores apropiados para el estudio

Considerando que el uso de distintos marcadores moleculares nos relatan historias diferentes dependiendo de su naturaleza genómica (núcleo, cloroplasto o mitocondria), el análisis en este estudio se basó en dos tipos de marcadores moleculares: secuencias de ADNcp y Microsatélites de núcleo (SSRn). En ambos marcadores la variación genética observada es neutral, por lo tanto el criterio que se siguió para identificar los posibles centros de domesticación en el acervo génico Mesoamericano del frijol Lima, estuvo basado únicamente en la inferencia de las relaciones genéticas entre las accesiones silvestres y domesticadas de éste acervo, por tal motivo se eligieron loci que muestren suficiente variación genética dentro del sistema de estudio que sea útil para resolver las relaciones genéticas a nivel de poblaciones (los espaciadores intergénicos de cloroplasto *atpB-rbcL* y *trnL-trnF* y SSRn; Motta-Aldana *et al.*, 2010; Martínez-Castillo *et al.* 2007; 2006).

Por un lado, las secuencias de ADNcp presentan algunos beneficios en comparación a los marcadores de ADN de núcleo (ADNn). Son de herencia uniparental situación que los hace ideales para estudiar la ancestría maternal, presentan una tasa de mutación (0.8×10^{-9}) más baja en comparación a los SSRn (Wolfe *et al.*, 1987; Holwerda *et al.*, 1986). Además las secuencias de ADNcp reducen los problemas de homología y pueden ser analizados filogenéticamente para obtener un árbol de genes lo que nos permite buscar cambios genéticos dentro de una especie a través del tiempo, siendo analizadas dentro del marco de la teoría de la coalescencia (Olsen y Schaal, 2006). El segundo marcador analizado fueron SSRn, que a diferencia de las secuencias de ADNcp las relaciones genealógicas de los alelos microsatélites no son fácilmente inferidas y esto limita su uso en estudios filogenéticos y evolutivos. Por otro lado, los SSRn son muy abundantes en el genoma, su mayor tasa de mutación (1×10^{-6} a 1×10^{-2}) los hace más variables que los marcadores de ADNcp, son de herencia biparental y es más fácil obtener datos de múltiples loci en comparación a las secuencias de ADNcp (Olsen y Schaal, 2006; Schlotterer, 2000).

Ambos tipos de marcadores fueron elegidos debido a que las diferencias en las tasas de mutación permiten la reconstrucción de la historia evolutiva de una especie en múltiples niveles por ejemplo: entre un taxón y sus parientes más cercanos y dentro del taxón a diferentes niveles (Breton *et al.*, 2006). Ambos marcadores mostraron adecuarse muy bien para evaluar el origen de domesticación del frijol Lima, sin embargo los dos marcadores presentan algunas limitaciones que merecen ser comentadas. 1) En primera instancia, ni las secuencias de ADNcp ni los SSRn son apropiados para establecer el tiempo en el que un cultivo fue domesticado y 2) otra limitante involucra el muestreo, pues la robustez de las conclusiones dependerán de un adecuado muestreo de las poblaciones silvestres (Olsen y Schaal, 2006). En este estudio el muestreo incluyó accesiones silvestres localizadas a través del rango completo de distribución de *P. lunatus*, sin embargo, es importante mencionar que sería de gran utilidad en estudios futuros incrementar el número de accesiones de las regiones de Centro América y Sur América. Otros procesos que podrían complicar la determinación de los centros de domesticación originales y la interpretación de los patrones observados con marcadores moleculares serían la introgresión entre poblaciones silvestres y domesticadas después de la domesticación, así como, eventos de extinción de haplotipos en las poblaciones silvestres ancestrales (Serrano-serrano *et al.*, 2012).

Domesticación del acervo génico mesoamericano del frijol Lima

A pesar de que el rango de distribución geográfico del frijol Lima silvestre, el cual ha sido datado entre 500,000 y 1,000,000 años de edad, parece haber sido afectado por un evento de fragmentación (Serrano-Serrano *et al.*, 2010), se puede asumir que su rango de distribución geográfica no ha cambiado mucho desde que ocurrió su domesticación hace aproximadamente 8,000 años (Piperno, 2011; Kaplan y Lynch, 1999), tiempo en el cual solo pudieron haber ocurrido algunas oscilaciones en temperatura y rango altitudinal (Piperno, 2006; Cardich, 1985). Bajo éste escenario se interpretó la discusión general de este estudio.

En conjunto, los resultados obtenidos con los dos tipos de marcadores usados en la investigación, espaciadores intergénicos de ADN de cloroplasto (ADNcp; *atpB-rbcL* y *trnL-trnF*) y microsatélites de núcleo (secuencias simples repetidas SSR), indican la existencia de dos grupos: MI y MII, ambos conteniendo tanto poblaciones silvestres como

cultivadas y con un rango de distribución geográfica específico. Estos resultados dan soporte a lo reportado recientemente por Serrano-Serrano *et al.* (2012, 2010) quienes propusieron por vez primera la existencia de dos grupos al interior del acervo génico mesoamericano del frijol Lima (GM). Con respecto al área de domesticación, los resultados obtenidos a partir de secuencias de ADNcp muestran que cada grupo quedo representado por un único haplotipo ancestral, el haplotipo G para MI y el haplotipo T para MII, dando evidencia de al menos dos eventos de domesticación en el GM. Este resultado se ve apoyado por los resultados obtenidos con los marcadores SSR, los cuales también indicaron la formación de los dos grupos correspondientes a MI y MII. Tomando toda la evidencia en su conjunto, y debido a las relaciones genéticas más cercanas observadas entre las accesiones silvestres y cultivadas de MI localizadas en la región Centro-occidente y Sur-occidente de México (Nayarit, Colima, Michoacán, Jalisco y Guerrero), los resultados indican que la domesticación de MI pudo tener lugar en algún sitio específico dentro de ésta región. Ésta región ha sido considerada como cuna de la agricultura en Mesoamérica (Zizumbo-Villarreal y Colunga-García Marín, 2010; Ranere *et al.*, 2009; Piperno, 2006) y también ha sido propuesta como centro de domesticación de los principales cultivos Mesoamericanos: maíz (Fukunaga *et al.*, 2005; Matsuoka *et al.*, 2002), frijol común (Nanni *et al.*, 2011; Kwak *et al.*, 2009) y calabaza (Sanjur *et al.*, 2002). Sin embargo la evidencia existente permite sugerir que estos cultivos no fueron domesticados en la misma región (por ejemplo el maíz habría sido domesticado en la cuenca mediana del río Balsas en Guerrero y el frijol común en la cuenca mediana del río Grande de Santiago en Jalisco) y probablemente su domesticación se remonta a diferentes fechas (Nanni *et al.*, 2011; Kwak *et al.*, 2009; Fukunaga *et al.*, 2005; Matsuoka *et al.*, 2002). Las fechas radiocarbónicas para el frijol Lima indican una edad entre 1,300 y 1,400 años de antigüedad en Mesoamérica, lo que hace suponer que el frijol Lima fue adoptado en la agricultura Mesoamericana después de la adopción de la terna de cultivos principales domesticados en esta región (Kaplan y Lynch, 1999).

Por otro lado, las relaciones genéticas más cercanas entre las accesiones silvestres y cultivadas de MII observadas en la región de Centro América (Guatemala, El Salvador, Honduras y Costa rica), nos permiten suponer que un segundo evento de

domesticación involucrando a MII pudo haber ocurrido en algún sitio de esa región. Los datos de SSR indican que MII pudo haber sido domesticado en la región que actualmente abarca el país de Guatemala; sin embargo los resultados obtenidos con los datos de secuencias de ADNcp indican una región más amplia (Guatemala, Honduras y Costa Rica). Considerando los resultados obtenidos con ambos marcadores, se propone que el centro de domesticación de MII puede estar ubicado en la región de Guatemala. Este resultado se ve apoyado con estudios previos en donde se ha sugerido al área de Guatemala como posible centro de domesticación y diversificación de *P. lunatus* (Fofana *et al.*, 2001; Gutiérrez-Salgado *et al.*, 1995; Sauer, 1994). Es importante señalar que las áreas de domesticación fueron propuestas tomando en cuenta la distribución actual del material silvestre asociado al domesticado, aclarando que esta distribución podría no corresponder exactamente a la distribución ancestral del material silvestre.

En contraste a los resultados aquí propuestos, los estudios más recientes sobre la domesticación de GM han indicado un solo evento de domesticación que involucra al acervo génico MI ubicado en el centro-occidente de México (Serrano-Serrano *et al.*, 2012; Motta-Aldana *et al.*, 2010). Sin embargo, estas diferencias pueden ser atribuidas, en parte, al rango de muestreo. Serrano-Serrano *et al.* (2012) solamente analizaron la domesticación del frijol Lima de México, mientras que en nuestro estudio involucramos poblaciones de toda el área de distribución natural del frijol Lima. Por su parte, el estudio realizado por Motta-Aldana *et al.* (2010) no comprendió poblaciones de muchas regiones de México (costa del Pacífico y costa del Golfo de México) que han sido claves en los resultados obtenidos en este estudio. Finalmente, los resultados obtenidos en el trabajo con ambos marcadores señalaron la existencia de una fuerte reducción en la diversidad genética en las accesiones domesticadas del acervo génico mesoamericano del frijol Lima, esto como resultado de su domesticación. Este resultado confirma lo ya reportado en estudios recientes (Serrano-Serrano *et al.*, 2012; Motta-Aldana *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten concluir lo siguiente:

En primera instancia, las secuencias de ADNcp y los marcadores SSRn, además de mostrar ser útiles para estudios filogeográficos y de genética de poblaciones, respondiendo preguntas básicas que involucran el grado de relación entre las accesiones y el nivel de diversidad genética dentro de las accesiones. Ambos marcadores funcionaron muy bien en el estudio de la domesticación del acervo génico mesoamericano del frijol Lima, proporcionando información útil y complementaria.

En este estudio, por primera vez la evidencia filogeográfica y de genética de poblaciones se complementan, dando evidencia de una domesticación múltiple en el acervo genético mesoamericano del frijol lima.

Los resultados aquí expuestos, junto con los de Serrano-Serrano *et al.* (2012; 2010) y Motta-Aldana *et al.* (2010), confirman la existencia de tres principales acervos génicos dentro del rango de distribución natural del frijol Lima: AI, MI y MII, y no solamente dos (Mesoamericano y Andino) como comúnmente había sido señalado.

Dos centros de domesticación que involucra a los grupos MI y MII del acervo génico mesoamericano son propuestos: el centro de domesticación de MI estaría ubicado en el área que abarcan los estados de Nayarit, Jalisco, Michoacán y Guerrero, en el centro-occidente de México. El centro de domesticación de MII se ubicaría en el área de Guatemala.

Los resultados indican que la amplia distribución geográfica observada en las poblaciones domesticadas parece ser resultado de eventos postdomesticación.

Se observaron niveles de diversidad genética altos, tanto a nivel total como de grupos (AI, MI y MII).

A pesar de los altos niveles de diversidad observados, también se confirma que las accesiones domesticadas han reducido ampliamente su diversidad genética en comparación a las accesiones silvestres.

PERSPECTIVAS

A pesar del gran avance que este trabajo significa para el entendimiento de la domesticación del acervo génico mesoamericano del frijol Lima, es recomendable realizar trabajos a futuro que contemplen los siguientes aspectos:

Con el objetivo de determinar más claramente la existencia del segundo evento de domesticación que involucra a MII, se recomienda realizar estudios que contemplen un mayor número de poblaciones silvestres y principalmente más poblaciones domesticadas del área de Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica y en la región tropical de América del Sur, que nos permitan contrastar la hipótesis de domesticación en el frijol Lima mesoamericano.

Con base en los resultados generados en este trabajo se recomienda el desarrollo de estudios que estén enfocados a determinar las principales rutas de dispersión y migración humana que pudieron haber dado origen a la amplia distribución geográfica que presentan las poblaciones domesticadas del acervo génico mesoamericano del frijol Lima.

Debido a la gran reducción en diversidad genética (efecto fundador) observado en las poblaciones domesticadas, es recomendable desarrollar estudios que estén encaminados hacia la conservación de este germoplasma, así como de las accesiones silvestres, ya que ambos acervos pueden ser de gran utilidad para el mejoramiento genético de esta importante especie.

BIBLIOGRAFÍA

- Breton, C., G. Besnard y A.A. Bervillé (2006). Using multiple types of molecular markers to understand olive phylogeography. in: Documenting Domestication. New Genetic Data and Archaeological Paradigms, Zeder A.M., Bradley G.D., Emshwiller E. y Smith D.B. (eds.) University of California Press. London, England. pp. 143-152.
- Cardich, A. (1985). The fluctuating upper limits of cultivation in the Central Andes and their impact on Peruvian prehistory. *Advances in World Archaeology*, 4, 293-333.

- Fofana, B., P. du Jardin y J.P. Baudoin (2001). Genetic diversity in the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by chloroplast DNA (cpDNA) variations. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48, 437-445.
- Fukunaga, K., J. Hill, Y. Vigouroux, Y. Matsuoka, G.J. Sánchez, K. Liu, E.S. Buckler y F. Doebley (2005). Genetic diversity and population structure of teocintle. *Genetics*, 169, 2241-2254.
- Gutiérrez-Salgado, A., P. Gepts y D.G. Debouck (1995). Evidence for two gene pools of the Lima beans, *Phaseolus lunatus* L., in the Americas. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 42, 15-28.
- Holwerda, C.B., S. Jana y L.W. Crosby (1986) Chloroplast and mitochondrial DNA variation in *Hordeum vulgare* and *Hordeum spontaneum*. *Genetics*, 114, 1271-1291.
- Kaplan, L., y T.F. Lynch (1999). *Phaseolus* (Fabaceae) in archaeology: AMS radiocarbon dates and their significance for pre-colombian agriculture. *Economic Botany*, 53, 261-272.
- Kwak, M., J. Kami y P. Gepts (2009). The putative mesoamerican center of domestication of *Phaseolus vulgaris* L. is located in the Rio Lerma-Santiago basin of Mexico. *Crop Science*, 49, 554-563.
- Martínez-Castillo, J., D. Zizumbo-Villarreal, P. Gepts y P. Colunga-García Marín (2007). Gene flow and genetic structure in the wild-weedy-domesticated complex of *Phaseolus lunatus* L. in its Mesoamerican center of domestication and diversity. *Crop Science*, 47, 58-66.
- Martínez-Castillo, J., D. Zizumbo-Villarreal, P. Gepts, P. Delgado-Valerio y P. Colunga-García-Marín (2006). Structure and genetic diversity of wild populations of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Yucatan peninsula, Mexico. *Crop Science*, 46, 1071-1080.
- Matsuoka, Y., Y. Vigouroux, M.M. Goodman, G.J. Sanchez, E. Buckler y J. Doebley (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*, 99, 6080-6084.
- Motta-Aldana, J., M.L. Serrano-Serrano, H.J. Torres, C.G. Villamizar, G.D. Debouck y M.I. Chacón (2010). Multiple origins of Lima bean landraces in the Americas: evidence from chloroplast and nuclear DNA polymorphisms. *Crop science*, 50, 1773-1787.

- Nanni, L., E. Bitocchi, E. Bellucci, M. Rossi, D. Rau, G. Attene, P. Gepts y R. Papa (2011). Nucleotide diversity of a genomic sequence similar to SHATTERPROOF (*PvSHP1*) in domesticated and wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 123, 1341-1357.
- Olsen, M.K. y B.A. schaal (2006). DNA sequence data and inferences on Cassava's origin of domestication. In: *Documenting Domestication. New Genetic Data and Archaeological Paradigms*, Zeder A.M., Bradley G.D., Emshwiller E. y Smith D.B. (eds.) University of California Press. London, England. pp. 123-133.
- Piperno, D.R. (2011). The origins of plant cultivation and domestication in the new world tropics: patterns, process and new developments. *Current Anthropology*, DOI: 10.1086/659998.
- Piperno, D.R. (2006). Quaternary environmental history and agricultural impact on vegetation in Central America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 93, 274-296.
- Ranere, A.J., D.R. Piperno, I. Holst, R. Dickau, y J. Iriarte (2009). The cultural and chronological context of early Holocene maize and squash domestication in the central Balsas river valley, Mexico. *Proceedings of the National Academic Sciences USA*, 106, 5014-5018.
- Sanjur, O.I., D.R. Piperno, T.C. Andrés y W.B. 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. *Proceedings of the National Academic Sciences USA*, 99, 535-540.
- Sauer, D.J. (1994). *Historical Geography of Crop Plants*: CRC Press, Los Angeles CA. 309 p.
- Serrano-Serrano, M.L., J. Hernandez-Torres, G. Castillo-Villamizar, D.G. Debouck y M.I. Chacón (2010). Gene pools in wild Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Americas: Evidences for an Andean origin and past migrations. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 54, 76-87.
- Serrano-Serrano, M.L., R.H. Andueza-Noh, J. Martínez-Castillo, D.G. Debouck, y M.I. Chacón (2012). Evolution and domestication of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Mexico: Evidence from ribosomal DNA. *Crop Science*, 52, 1698-1712.
- Schlötterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, 365-371.

Wolfe, K.H., W.H. Li, y P.M. Sharp (1987). Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84, 9054-9058.

Zizumbo-Villarreal, D. y P. Colunga-García Marín (2010). Origin of agriculture and plant domestication in west Mesoamerica. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57, 813-825.

ANEXOS

ANEXO 1. Supplementary material S1. Geographic localización, haplotype, and gene pool belong to wild and domesticated accessions of *Phaseolus lunatus* used in the present study.

Id accession	Country	Biological status	Latitude	Longitude	Haplotype	Gene pool	Genbank accession +
G25059	Brasil	D	-34.40 S	-58.30 W	JI	MI	JX170482/JX170639
G25195	Guatemala	D	14.7 N	-89.9 W	G	MI	JX170380/JX170536
G25216	Guatemala	D	15.3833 N	-90.4 W	H	MI	JX170412/JX170569
G25224A	Costa Rica	D	107.667 N	-85.4833 W	T	MII	JX170467/JX170624
G25229	Mexico	W	20.8333 N	-105.4 W	G	MI	JX170424/JX170581
G25234	Mexico	W	20.3167 N	-89.4167 W	G	MI	JX170381/JX170537
G25240	Guatemala	D	14.4333 N	-91.2833 W	G	MI	JX170454/JX170611
G26264	Guatemala	D	15.5833 N	-88.7167 W	G	MI	JX170528/JX170685
G25278	Salvador	D	13.7 N	-88.9667 W	G	MI	JX170382/JX170538
G25284	Guatemala	W	14.6167 N	-89.9833 W	H	MI	JX170403/JX170560
G25285	Guatemala	D	15.4833 N	-90.3167 W	E1	MI	JX170456/JX170613
G25290	Guatemala	W	14.55 N	-90.7167 W	T	MII	JX170383/JX170539
G25290A*	Guatemala	W	14.55 N	-90.7167 W	T	MII	JX170476/JX170633
G25303	Mexico	D	16.25 N	-92.1333 W	G	MI	JX170401/JX170557
G25318	Jamaica	D	18.0167 N	-76.7833 W	B1	MI	JX170431/JX170588
G25319	Jamaica	D	18.25 N	-77.6167 W	G	MI	JX170451/JX170608
G25385B	Costa Rica	D	99.833 N	-84.0667 W	T	MII	JX170384/JX170540
G25388	Costa Rica	D	99.833 N	-84.0667 W	T	MII	JX170479/JX170636
G25391B	Costa Rica	D	99.833 N	-84.0667 W	T	MII	JX170385/JX170541
G25392B	Costa Rica	D	99.833 N	-84.0667 W	T	MII	JX170422/JX170579
G25397	Costa Rica	D	10 N	-84.2 W	G	MI	JX170386/JX170542
G25400	Colombia	D	21.167 N	-76.95 W	G	MI	JX170510/JX170668
G25508	Colombia	D	88.833 N	-75.6167 W	G	MI	JX170459/JX170616

Capítulo IV

G25535	Colombia	D	5.2 N	-74.7333 W	G	MI	JX170507/JX170665
G25559	Mexico	D	17 N	-92.8833 W	G	MI	JX170415/JX170572
G25586B	Costa Rica	D	10.65 N	-85.4667 W	V	MII	JX170387/JX170543
	El						JX170511/JX170669
G25595	Salvador	D	13.7667 N	-88.0833 W	G	MI	
G25596A	Costa Rica	D	10.0667 N	-84.15 W	G	MI	JX170420/JX170577
G25597	Guatemala	D	14.2667 N	-90.3 W	G	MI	JX170388/JX170544
G25604	Guatemala	D	15.35 N	-91.3 W	H	MI	JX170521/JX170679
G25614	Mexico	D	17.3 N	-96.9 W	G	MI	JX170520/JX170678
G25700A	Panama	D	86.667 N	-80.2833 W	G	MI	JX170460/JX170617
G25701	Venezuela	D	89.333 N	-65.6667 W	G	MI	JX170461/JX170618
G25703	Colombia	D	13.833 N	-77.15 W	G	MI	JX170453/JX170610
G25704	Mexico	W	20.8 N	-103.4 W	G	MI	JX170501/JX170659
G25714	Mexico	w	19.21 N	89.40 W	G	MI	JX170474/JX170631
G25705	Mexico	D	19.4167 N	-89.7 W	G	MI	JX170389/JX170545
G25735	Mexico	D	20.2333 N	-89.9333 W	G	MI	JX170413/JX170570
G25737	Mexico	W	20.2167 N	-89.9167 W	G	MI	JX170428/JX170570
G25750	Mexico	D	20.4 N	-90.2333 W	G	MI	JX170416/JX170573
G25759	Mexico	W	19.5833 N	-90.25 W	H	MI	JX170421/JX170578
JMC19-2	Mexico	W	.	.	T	MII	JX170508/JX170666
G25762	Mexico	W	19.7667 N	-89.8667 W	G	MI	JX170425/JX170582
G25766	Mexico	D	20.1333 N	-90.2167 W	H	MI	JX170409/JX170566
G25770	Mexico	D	20.2 N	-89.9 W	G	MI	JX170390/JX170546
G25771	Mexico	D	20.2 N	-89.9 W	G	MI	JX170411/JX170568
G25787	Mexico	D	19.5833 N	-89.6 W	G	MI	JX170410/JX170567
G25789	Mexico	W	19.5833 N	-89.6 W	G	MI	JX170407/JX170564
G25811A	Colombia	D	96.667 N	-75.2 W	G	MI	JX170434/JX170591
G25812	Colombia	D	109.167 N	-74.7667 W	G	MI	JX170477/JX170634
G25839	Peru	D	-61.167 S	-77.8333 W	G	MI	JX170455/JX170612
G25844	Guatemala	W	14.4833 N	-90.7167 W	T	MII	JX170377/JX170533
G25850	Guatemala	W	14.4 N	-90.85 W	T	MII	JX170417/JX170574
G25852	Colombia	D	14.833 N	-77.4167 W	G	MI	JX170481/JX170638
G25974	Guatemala	D	14.6333 N	-89.7333 W	G	MI	JX170427/JX170584
G26045	Brazil	D	-81.667 S	-35.2333 W	Z	MII	JX170478/JX170635
G26157	Brazil	D	-16.0667 S	-57.6833 W	G	MI	JX170484/JX170641
G26282	Peru	D	-6.5 S	-76.3667 W	G	MI	JX170462/JX170619
G26306	Guatemala	D	14.55 N	-89.4833 W	G	MI	JX170391/JX170547
G26323	Colombia	D	92.333 N	-74.4333 W	I1	MII	JX170480/JX170637
G26355	Mexico	W	21.05 N	-102.666 W	G	MI	JX170392/JX170548

G26438	Costa Rica	D	9.9 N	-83.6833 W	G	MI	JX170418/JX170575
G26444	Honduras	D	14.2833 N	-88.25 W	NI	MII	JX170522/JX170680
G26451	Panama	D	83.333 N	-82.3333 W	G	MI	JX170405/JX170562
G26517	Mexico	W	16.6667 N	-98.45 W	G	MI	JX170406/JX170563
G26519	Mexico	W	16.8667 N	-99.25 W	T	MII	JX170393/JX170549
G26531	Mexico	W	16.9 N	-92.05 W	G	MI	JX170394/JX170550
G26533	Mexico	W	14.8333 N	-92.2667 W	G	MI	JX170423/JX170580
G26534	Mexico	D	16.3333 N	-92.4333 W	H	MI	JX170426/JX170583
G26537	Mexico	W	16.4833 N	-93.65 W	W	MI	JX170395/JX170551
G26539	Mexico	W	16.85 N	-96.4333 W	T	MII	JX170396/JX170552
G26540	Mexico	W	14.8333 N	-92.5 W	G	MI	JX170397/JX170553
G26543	Mexico	W	14.9167 N	-92.3333 W	G	MI	JX170402/JX170559
G26630	Honduras	W	14.9333 N	-86.2167 W	T	MII	JX170378/JX170534
G26634	Honduras	W	13.8167 N	-87.2667 W	T	MII	JX170414/JX170571
G26635	Honduras	W	13.7667 N	-87.1667 W	T	MII	JX170398/JX170554
G26655	Guatemala	W	14.4167 N	-90.8167 W	T	MII	JX170379/JX170535
G26680	Guatemala	W	14.35 N	-90.8 W	T	MII	-
G26681	Guatemala	W	14.4 N	-91.1833 W	T	MII	JX170430/JX170587
G26684	Guatemala	W	14.7667 N	-91.1667 W	T	MII	JX170399/JX170555
G26731	Guatemala	W	14.9333 N	-89.95 W	T	MII	JX170429/JX170586
G26732	Guatemala	W	14.6667 N	-89.7833 W	T	MII	JX170400/JX170556
G26739	Mexico	W	16.0333 N	-93.7 W	D	MI	JX170452/JX170609
G26740	Mexico	W	16.45 N	-95.0167 W	D	MI	JX170450/JX170607
G26741	Mexico	W	15.9.667 N	-97.1167 W	G	MI	EU908926/EU909109
G26742	Mexico	W	15.9667 N	-97.4667 W	G	MI	JX170404/JX170561
G26753	Mexico	W	16.3333 N	-92.45 W	T	MII	JX170376/JX170532
G26754	Mexico	W	16.4833 N	-92.5167 W	T	MII	JX170408/JX170565
G27338	Guatemala	W	14.55 N	-90.7333 W	T	MII	JX170419/JX170576
JMC1063	Mexico	W	17.0047 N	-95.0122 W	G	MI	JX170502/JX170660
JMC1068	Mexico	W	15.9756 N	-95.5397 W	H1	MI	JX170471/JX170628
JMC1069	Mexico	W	15.7672 N	-96.26 W	T	MII	JX170473/JX170630
JMC1082	Mexico	W	17.7864 N	-96.3292 W	T	MII	JX170472/JX170629
G25256	Mexico	D	14.3448 N	89.1412 W	G	MI	JX170487/JX170645
JMC1084	Guatemala	W	16.9278 N	-89.9272 W	T	MII	JX170488/JX170646
JMC1089	Guatemala	W	16.5231 N	-89.4197 W	G	MI	JX170485/JX170642
JMC1097	Guatemala	W	17.2258 N	-89.9539 W	P	MII	JX170489/JX170647
JMC1099	Guatemala	W	17.3761 N	-89.6333 W	Q1	MII	JX170492/JX170650
G25604	Guatemala	D	15.1236 N	91.1048 W	H	MI	JX170521/JX170679

Capítulo IV

JMC1101	Guatemala	W	17.0164 N	-89.2944 W	G	MI	JX170486/JX170644
JMC1104	Guatemala	D	16.9292 N	-89.8908 W	H	MI	JX170466/JX170623
JMC1105	Guatemala	D	16.9292 N	-89.8908 W	P1	MI	JX170475/JX170632
JMC1106	Guatemala	D	16.9292 N	-89.8908 W	H	MI	JX170483/JX170640
JMC1107	Guatemala	D	16.9292 N	-89.8908 W	H	MI	JX170440/JX170597
G25256	Guatemala	D	14.58 N	89.32 W	M1	MI	JX170487/JX170645
JMC1108	Mexico	W	20.8608 N	-103.770 W	C1	MI	JX170444/JX170601
JMC1109	Mexico	W	21.0361 N	-104.343 W	G	MI	JX170449/JX170606
JMC1113	Mexico	W	22.4886 N	-105.377 W	G	MI	JX170446/JX170603
JMC1119	Mexico	W	23.6356 N	-106.579 W	H	MI	JX170435/JX170592
JMC1123	Mexico	W	25.3772 N	-107.557 W	H	MI	JX170469/JX170626
JMC1124	Mexico	W	23.1614 N	-106.091 W	G	MI	JX170468/JX170625
JMC1125	Mexico	W	23.0464 N	-105.95 W	H	MI	JX170470/JX170627
JMC1129	Mexico	W	20.6467 N	-105.237 W	H	MI	JX170490/JX170648
JMC1131	Mexico	W	20.1703 N	-105.333 W	H	MI	JX170505/JX170663
JMC1141	Mexico	W	19.6603 N	-104.439 W	H	MI	JX170437/JX170594
JMC1142	Mexico	W	19.1161 N	-104.102 W	H	MI	JX170436/JX170593
G26278	Mexico	W	.	.	F1	MI	JX170457/JX170614
JMC1144	Mexico	W	18.6722 N	-103.675 W	J	MI	JX170448/JX170605
JMC1145	Mexico	W	18.4647 N	-103.541 W	D1	MI	JX170447/JX170604
JMC1146	Mexico	W	18.2533 N	-103.246 W	J	MI	JX170439/JX170596
JMC1147	Mexico	W	18.1925 N	-103.044 W	J	MI	JX170443/JX170600
JMC1148	Mexico	W	18.0944 N	-102.784 W	L1	MI	JX170495/JX170653
JMC1149	Mexico	W	18.0019 N	-102.085 W	J	MI	JX170441/JX170598
Acosta-7	Mexico	W	.	.	G	MI	JX170465/JX170622
JMC1150	Mexico	W	17.7392 N	-101.739 W	J	MI	JX170438/JX170595
JMC1151	Mexico	W	17.4986 N	-101.253 W	G	MI	JX170499/JX170657
JMC1152	Mexico	W	17.3703 N	-101.084 W	G	MI	JX170445/JX170602
JMC1154	Mexico	W	17.1508 N	-100.492 W	K1	MI	JX170491/JX170649
Acosta-6	Mexico	W	.	.	G1	MI	JX170458/JX170615
JMC1155	Mexico	W	18.1539 N	-93.2611 W	T	MII	JX170498/JX170656
JMC1156	Mexico	W	18.3236 N	-93.1919 W	G	MI	JX170504/JX170662
JMC1158	Mexico	W	17.8828 N	-94.8125 W	H	MI	JX170497/JX170655
JMC1163	Mexico	W	18.3992 N	-95.1761 W	T	MII	JX170500/JX170658
JMC1166	Mexico	W	18.4772 N	-92.4714 W	T	MII	JX170503/JX170661
JMC1168	Mexico	W	19.5997 N	-96.3983 W	G	MI	JX170494/JX170652
JMC1174	Mexico	W	22.5514 N	-99.0783 W	G	MI	JX170442/JX170599
JMC1175	Mexico	W	20.4328 N	-97.3747 W	G	MI	JX170496/JX170654

JMC1176	Mexico	W	18.62 N	-92.1119 W	G	MI	JX170506/JX170664
Rol224Lepiz	Mexico	W	20.8347 N	-103.967 W	H	MI	JX170493/JX170651
Rol444Lepiz	Mexico	W	20.8319 N	-103.735 W	G	MI	JX170463/JX170620
Rol464Lepiz	Mexico	W	20.6639 N	-103.723 W	G	MI	JX170464/JX170621
JMC20- Bacalar	Mexico	D	18.7108 N	-88.3672 W	G	MI	JX170525/JX170682
JMC4-Sn Silver	Mexico	D	20.3583 N	-88.0275 W	H	MI	JX170523/JX170681
JMC24-Hazil	Mexico	D	21.1375 N	-86.8528 W	G	MI	JX170433/JX170590
JMCH- Ekbalam	Mexico	D	20.1219 N	-89.0653 W	G	MI	JX170516/JX170674
JMCK-Xoy	Mexico	D	20.1228 N	-88.9708 W	H	MI	JX170518/JX170676
JMC3-Xocen	Mexico	D	20.5997 N	-88.1633 W	G	MI	JX170432/JX170589
JMC10- Xohuayan10	Mexico	W	20.3017 N	-89.4181 W	G	MI	JX170515/JX170673
JMC11- Nocacab	Mexico	W	20.9792 N	-87.6408 W	T	MI	JX170513/JX170671
JMC12- Xohuayan12	Mexico	W	20.1683 N	-89.3847 W	Q1	MII	JX170512/JX170670
JMC20- Bolnchen	Mexico	W	19.8472 N	-90.4867 W	G	MII	JX170525/JX170682
JMC21- Chunchintok	Mexico	W	19.3583 N	-89.59 W	H	MI	JX170519/JX170677
JMC1-C.Rojo	Mexico	D	19.8456 N	-90.5239 W	G	MI	JX170514/JX170672
G25108	Brazil	D	-25.4167 S	-49.4167 W		-	-
G25236	Argentina	D	-34.6667 S	-58.5 W	G	MI	GU126297/GU126345
G25254	Guatemala	D	14.4333 N	-91.2833 W	T	MI	GU126306/GU126354
G25285	Guatemala	D	14.6167 N	-89.9833 W	G	MI	GU126299/GU126347
G25289	Mexico	D	16.75 N	-93.1167 W	G	MI	GU126300/GU126347
G25295	Cuba	D	22.5343 N	-81.1079 W	G	MI	GU126295/GU126343
G25298	Cuba	D	21.8167 N	-82.9667 W	G	MI	GU126301/GU126349
G25366	El Salvador	D	13.6667 N	-89.3 W	G	MI	GU126296/GU126344
G25367	El Salvador	D	14.1167 N	-89.4833 W	G	MI	GU126294/GU126342
G25393	Costa Rica	D	99.833 N	-84.0667 W	G	MI	GU126282/GU126330
G25410	Ecuador	D	-0.2333 S	-78.5 W	G	MI	GU126303/GU126351
G25420	Peru	D	-3.55 S	-80.4667 W	Y	AI	GU126322/GU126370
G25538	Costa Rica	D	10 N	-84.2 W	T	MII	GU126307/GU126355
G25540	Argentina	D	-25.2667 S	-65.5 W	Y	AI	GU126309/GU126357
G25543	Argentina	D	-27.8 S	-64.25 W	G	MI	GU126278/GU126326
G25577	Peru	D	-3.75 S	-73.1833 W	G	MI	GU126277/GU126325
G25717	Mexico	D	19.7267 N	-90.3208 W	G	MI	GU126279/GU126327

Capítulo IV

G25826	Peru	D	-76.333 S	-78.0333 W	X	AI	GU126308/GU126356
G25909	Peru	D	-6.25 S	-77.7167 W	Y	AI	GU126324/GU126372
G25910	Colombia	D	1.2 S	-76.8333 W	Y	AI	GU126310/GU126358
G25971	Mexico	D	16.75 N	-92.6667 W	G	MI	GU126280/GU126328
G25981	Bolivia	D	-18.3 S	-65.2167 W	Y	AI	GU126311/GU126359
G25983	Bolivia	D	-18.95 S	-65.15 W	Y	AI	GU126312/GU126360
G25987	Bolivia	D	-19.3167 S	-64.3 W	Y	AI	GU126313/GU126361
G26002	Brazil	D	-70.333 S	-42.1667 W	.	-	-
G26029	Peru	D	-14.8333 S	-74.95 W	Y	AI	GU126314/GU126362
G26044	Brazil	D	-10.0972 S	-38.2105 W	G	MI	GU126283/GU126331
G26109	Brazil	D	-20.7333 S	-41.5 W	G	MI	GU126304/GU126352
G26146	Brazil	D	-31.75 S	-52.3333 W	G	MI	GU126284/GU126332
G26211	Brazil	D	-16.0667 S	-57.6833 W	G	MI	GU126289/GU126337
G26259	Ecuador	D	-0.4 S	-76.6167 W	Y	AI	GU126315/GU126363
G26290	Argentina	D	-26.1833 S	-58.1833 W	G	MI	GU126281/GU126329
G26302	Guatemala	D	14.7833 N	-90.7833 W	G	MI	GU126288/GU126336
G26480	Ecuador	D	-33.333 S	-79.5667 W	Y	AI	GU126316/GU126364
G26498	Colombia	D	32.167 S	-75.65 W	Y	AI	GU126317/GU126365
G26656	Colombia	D	57.333 S	-75.4667 W	Y	AI	GU126318/GU126366
G26659	Ecuador	D	-22.333 S	-78.9 W	Y	AI	GU126319/GU126367
G26672	Ecuador	D	0.4 S	-77.95 W		-	GU126323/GU126371
G26706	Colombia	D	5.45 S	-75.4833 W	G	MI	GU126290/GU126338
G26744	Colombia	D	4.4 S	-76.1667 W	G	MI	GU126291/GU126339
G26745	Colombia	D	4.4 S	-76.1667 W	G	MI	GU126292/GU126340
G27289	Cuba	D	21.8333 N	-78.7667 W	G	MI	GU126293/GU126341
G27332	Peru	D	-87.167 S	-78.1 W		-	GU126320/GU126368
G27337	Bolivia	D	-16.7167 S	-68.05 W	Y	AI	GU126321/GU126369
G25222	Guatemala	W	15.1 N	-89.3667 W	T	MII	EU908894/EU909067
G25227	Costa Rica	W	100.167 N	-84.1333 W	T	MII	EU908909/EU909096
G25228	Mexico	W	20.9 N	-105.383 W	E	MI	EU908870/EU909051
G25230	Mexico	W	19.05 N	-104.233 W	H	MI	EU908883/EU909046
G25233	Belize	W	17.2 N	-89.1333 W	T	MII	EU908895/EU909082
G25272	Guatemala	W	14.2667 N	-90.3 W	T	MII	EU908896/EU909092
	El						EU908886/EU909071
G25273A	Salvador	W	13.95 N	-89.8167 W	T	MII	
G25294C	Cuba	W	23.1667 N	-81.2667 W	N	MII	EU908880/EU909057
G25385A	Costa Rica	W	99.833 N	-84.0667 W	U	MII	EU908890/EU909064
G25584A	Costa Rica	W	10.7667 N	-85.4833 W	T	MII	EU908887/EU909063
G25704	Mexico	W	20.8 N	-103.4 W	G	MI	EU908872/EU909094

G25713A	Mexico	W	19.35 N	-89.6667 W	G	MI	EU908873/EU909052
G25785	Mexico	W	20.05 N	-89.7333 W	G	MI	EU908910/EU909097
G25816	Mexico	W	20.9333 N	-89.0167 W	T	MII	EU908897/EU909095
G25819	Colombia	W	10.8833 S	-74.05 W	J	MI	EU908882/EU909047
G25843	Mexico	W	18.65 N	-99.2 W	G	MI	EU908911/EU909106
G25851	Mexico	W	18.9333 N	-99.0333 W	G	MI	EU908874/EU909081
G25911	Gautemala	W	14.5167 N	-91.6667 W	T	MII	EU908891/EU909066
G25912	Guatemala	W	14.45 N	-90.8167 W	T	MJI	EU908892/EU909070
G25913	Peru	W	-66.167 N	-78.8667 W	C	AI	EU908902/EU909056
G25963	Costa Rica	W	9.8 N	-84.1167 W	T	MII	EU908912/EU909104
G25966	Costa Rica	W	99.167 N	-84 W	V	MII	EU908913/EU909100
G25977	Guatemala	W	14.3167 N	-90.95 W	I	MI	EU908914/EU909080
G26309	Colombia	W	10.7167 N	-74.1167 W	O	MII	EU908881/EU909105
G26348	Peru	W	-6.35 N	-79.4 W	C	AI	EU908904/EU909084
G26360	Mexico	W	18.7333 N	-98.45 W	G	MI	EU908875/EU909050
G26459	Ecuador	W	-39.333 N	-79.4 W	C	AI	EU908905/EU909055
G26468	Ecuador	W	-17.833 N	-79.1333 W	B	AI	EU908901/EU909044
G26469	Ecuador	W	0.2667 N	-78.55 W	C	AI	EU908915/EU909107
G26508	Guatemala	W	16.9167 N	-89.9 W	P	MII	EU908879/EU909062
G26515	Colombia	W	11.0333 N	-74.8833 W	T	MII	EU908898/EU909069
G26516	Mexico	W	15.8167 N	-93.4333 W	D	MI	EU908916/EU909090
G26518	Mexico	W	16.7833 N	-99.1833 W	F	MI	EU908869/EU909088
G26527	Colombia	W	87.167 N	-75.4667 W	S	MII	EU908885/EU909098
G26530	Colombia	W	5 S	-73.5167 W	T	MII	EU908893/EU909068
G26535	Mexico	W	16.8833 N	-92.1167 W	G	MI	EU908876/EU909089
G26541	Mexico	W	18.5 N	-97.2167 W	I	MI	EU908917/EU909079
G26547	Peru	W	-11.1333 S	-75.3667 W	L	MII	EU908918/EU909061
G26606	Ecuador	W	-2.25 S	-78.9167 W	C	AI	EU908903/EU909054
G26608	Ecuador	W	-33.833 S	-79.5333 W	C	AI	EU908906/EU909085
G26609	Ecuador	W	-32.167 S	-79.2 W	C	AI	EU908908/EU909094
G26618A	Colombia	W	50.667 S	-73.4167 W	T	MII	EU908919/EU909083
G26628	Honduras	W	13.8333 N	-86.5333 W	R	MII	EU908884/EU909065
G26629	Honduras	W	14.8167 N	-85.8333 W	W	MII	EU908899/EU909103
G26631	Honduras	W	15.4 N	-86.45 W	G	MI	EU908871/EU909045
G26632	Honduras	W	15.3 N	-88.4833 W	T	MII	EU908900/EU909102
G26633	Honduras	W	14.7667 N	-88.6833 W	Q	MII	EU908920/EU909099
G26653	Guatemala	W	15.6833 N	-91.9 W	T	MII	EU908921/EU909108
G26683	Guatemala	W	14.7667 N	-91.5 W	G	MI	EU908922/EU909087

G26685	Argentina	W	-22.95 S	-63.8667 W	M	MII	EU908878/EU909060
G26687	Colombia	W	50.833 S	-73.55 W	T	MII	EU908923/EU909101
G26704	Colombia	W	56.167 S	-75.5333 W	G	MI	EU908877/EU909048
G26721	Ecuador	W	-33.333 S	-79.5667 W	A	AI	EU908868/EU909093
G26726	Costa Rica	W	10.15 N	-84.3333 W	T	MII	EU908924/EU909091
G26727	Costa Rica	W	10.2667 N	-84.85 W	T	MII	EU908925/EU909086
G26741	Mexico	W	15.9667 N	-97.1167 W	G	MI	EU908926/EU909109
G26749	Argentina	W	-24.2167 S	-64.65 W	K	MII	EU908889/EU909059
G26751A	Ecuador	W	0.1333 S	-78.4167 W	C	AI	EU908907/EU909053
G26164	Mexico	D	18.9833 N	-94.1 W	G	MI	GU126285/GU126333
G26227	Brazil	D	-12 S	-38.8833 W	G	MI	GU126286/GU126334
G26441	Guatemala	D	14.6167 N	-90.8 W	G	MI	GU126287/GU126335
	El						GU126298/GU126346
G25277	Salvador	D	13.7 N	-88.9667 W	G	MI	
	El						GU126302/GU126350
G25361	Salvador	D	13.9833 N	-89.6833 W	G	MI	
G26748	Colombia	D	4.4 S	-76.1667 W	G	MI	GU126305/GU126353
G26404	Argentina	w	-	-	K	MII	EU908888/EU909058

+ The first accession number corresponds to *atpB-rbcL* and the second to *trnL-trnF*.

Anexo 2. Ubicación geográfica de 150 accesiones silvestres y domesticadas del acervo génico Mesoamericano del frijol Lima evaluadas con 10 loci de microsatélites.

Id	País	Estatus	Latitud	Longitud	Altura	grupo
G25002	Brasil	Domesticad	12.52	50.36	358	MI
G26044	Brasil	Domesticad	10.54	37.07	5	MI
G26045	Brasil	Domesticad	-81.667	-35.2333	137	MI
G26157	Brasil	Domesticad	-16.0667	-57.6833	127	MI
G25059	Brasil	Domesticad	19.35	40.37	150	MI
G26134	Brasil	Domesticad	-21.6	-46.9	300	MI
G26143	Brasil	Domesticad	-31.75	-52.3333	7	MI
G25410	Ecuador	Domesticad	0.59	79.27	106	MI
G25400	Colombia	Domesticad	21.167	-76.95	988	MI
G25535	Colombia	Domesticad	5.2	-74.7333	225	MI
G25703	Colombia	Domesticad	13.833	-77.15	2000	MI
G25811A	Colombia	Domesticad	96.667	-75.2	-	MI
G25508	Colombia	Domesticad	88.833	-75.6167	49	MI
G25852	Colombia	Domesticad	14.833	-77.4167	1360	MI
G26323	Colombia	Domesticad	92.333	-74.4333	33	MI
G25812	Colombia	Domesticad	10.9167	-74.7667	7	MI
G25700A	Panamá	Domesticad	86.667	-80.2833	200	MI
G25393	Costa Rica	Domesticad	10.37	84.46	225	MI

G25388	Costa Rica	domesticado	9.59	84.04	1171	MI
G25585	Costa Rica	Silvestre	100.167	-84.1333	1100	MI
G25224A	Costa Rica	domesticado	107.667	-85.4833	100	MI
G26307	Costa Rica	domesticado	9.9	-83.7833	1000	MI
G26444	Honduras	domesticado	14.2833	-88.25	-	MI
G25701	Venezuela	domesticado	89.333	-65.6667	60	MI
G25273A	El Salvador	Silvestre	13.57	89.49	754	MI
G25277	El Salvador	domesticado	13.42	88.58	800	MI
G25364	El Salvador	domesticado	13.6667	-89.3	965	MI
G25595	El Salvador	domesticado	13.7667	-88.0833	400	MI
G25366	El Salvador	domesticado	14.07	89.29	400	MI
JMC1104	Guatemala	domesticado	16.9292	-89.8908	127	MI
JMC1105	Guatemala	domesticado	16.9292	-89.8908	127	MI
JMC1106	Guatemala	domesticado	16.9292	-89.8908	127	MI
JMC1107	Guatemala	domesticado	16.9292	-89.8908	127	MI
G26652	Guatemala	Silvestre	14.6167	-90.5667	1550	MII
G25285	Guatemala	domesticado	15.4833	-90.3167	1317	MII
G25284	Guatemala	Silvestre	14.6167	-89.9833	1362	MII
G26305	Guatemala	domesticado	14.55	-89.4833	700	MII
G25972	Guatemala	domesticado	14.6167	-89.6167	760	MII
G25222	Guatemala	Silvestre	15.06	89.22	50	MII
G25256	Guatemala	domesticado	14.58	89.32	-	MII
G25264	Guatemala	domesticado	15.5833	-88.7167	-	MII
JMC1089	Guatemala	Silvestre	16.5231	-89.4197	416	MII
JMC1097	Guatemala	Silvestre	17.2258	-89.9539	210	MII
JMC1099	Guatemala	Silvestre	17.3761	-89.6333	211	MII
JMC1101	Guatemala	Silvestre	17.0164	-89.2944	160	MII
G25272A	Guatemala	Silvestre	14.1	90.18	893	MI
G25285	Guatemala	Domesticado	15.4833	-90.3167	1317	MI
G25290A	Guatemala	Silvestre	14.55	-90.7167	1530	MI
G26653	Guatemala	Silvestre	15.41	91.54	590	MI
G25604	Guatemala	domesticado	15.35	-91.3	-	MI
G26683	Guatemala	Silvestre	14.46	91.30	1750	MI
G25992	Guatemala	domesticado	14.50	91.31	1749	MI
G25223	Guatemala	Silvestre	14.31	91.40	240	MI
G26446	Guatemala	Domesticado	14.32	91.41	239	MI
G26652	Guatemala	Silvestre	14.6167	-90.5667	1550	MI
G25240	Guatemala	Domesticado	14.4333	-91.2833	1790	MI
G26679	Guatemala	Silvestre	14.6333	-90.7667	1700	MI
G25977	Guatemala	Silvestre	14.19	90.57	490	MI
G26297	Guatemala	Domesticado	14.35	91.28	600	MII
G26682	Guatemala	Silvestre	14.5167	-91.1333	750	MII
G26454	Guatemala	Silvestre	14.7167	-91.15	-	MI
G25294	Cuba	Domesticado	23.10	81.16	3	MI
G25294	Cuba	Silvestre	23.10	81.16	3	MI
G25295	Cuba	Domesticado	21.57	83.02	-	MI
G25298	Cuba	Domesticado	20.01	75.49	-	MI
G25318	Jamaica	Domesticado	18.0167	-76.7833	-	MI
G25319	Jamaica	Domesticado	18.25	-77.6167	600	MI
G25233	Belice	Silvestre	17.12	89.08	40	MI
JMC1123	México	Silvestre	25.3772	-107.557	212	MI
JMC1124	México	Silvestre	23.1614	-106.091	79	MII
JMC1125	México	Silvestre	23.0464	-105.95	38	MII

Capítulo IV

JMC1119	México	Silvestre	23.6356	-106.579	125	MI
JMC1109	México	Silvestre	21.0361	-104.343	1810	MI
G26256	México	Silvestre	-	-	-	MII
G25550	México	domesticado	-	-	-	MII
JMC1113	México	Silvestre	22.4886	-105.377	1491	MII
JMC1135	México	Silvestre	19.4242	-105.013	15	MII
JMC1141	México	Silvestre	19.6603	-104.439	451	MII
JMC1129	México	Silvestre	20.6467	-105.237	10	MI
G25704	México	Silvestre	20.8	-103.4	1390	MII
Rol224Le	México	Silvestre	20.8347	-103.967	1472	MII
piz						
Rol444Le	México	Silvestre	20.8319	-103.735	1273	MII
piz						
Rol464Le	México	Silvestre	20.6639	-103.723	1317	MII
piz						
G25230	México	Silvestre	19.03	104.14	3	MII
G25231	México	Silvestre	19.0333	-104.216	3	MII
G25232	México	Silvestre	19.13	104.32	400	MII
JMC1142	México	Silvestre	19.1161	-104.102	10	MII
JMC1144	México	Silvestre	18.6722	-103.675	27	MII
G25843	México	Silvestre	18.39	99.12 O	900	MII
G25219	México	Silvestre	-	-	-	MII
G25851	México	Silvestre	18.56	99.02	1250	MII
G26278	México	Silvestre	-	-	-	MII
G26356A	México	Silvestre	18.65	-99.2	900	MI
JMC	México	Silvestre	18.0045	-102.092	11	MII
1148						
JMC1149	México	Silvestre	18.0019	-102.085	11	MII
JMC1145	México	Silvestre	18.4647	-103.541	30	MI
JMC1147	México	Silvestre	18.1925	-103.044	70	MI
JMC1146	México	Silvestre	18.2533	-103.246	70	MII
JMC1152	México	Silvestre	17.3703	-101.084	36	MII
JMC1150	México	Silvestre	17.7392	-101.739	15	MII
JMC1154	México	Silvestre	17.1508	-100.492	10	MII
JMC1151	México	Silvestre	17.4986	-101.253	30	MII
ACOSTA	México	Silvestre	18.3447	-99.5427	732	MI
6						
ACOSTA	México	Silvestre	17.5667	-99.4	1372	MII
7						
G25293	México	domesticado	17.85	100.22	-	MI
G26740	México	Silvestre	16.45	-95.0167	30	MI
G26741	México	Silvestre	15.9667	-97.1167	20	MI
JMC1068	México	Silvestre	15.9756	-95.5397	18	MI
JMC1069	México	Silvestre	15.7672	-96.26	137	MI
JMC1082	México	Silvestre	17.7864	-96.3292	133	MI
G25614	México	Domesticado	17.3	-96.9	1520	MI
JMC1166	México	Silvestre	18.4772	-92.4714	14	MI
JMC1163	México	Silvestre	18.3992	-95.1761	210	MI
G25221	México	Silvestre	-	-	20	MI
JMC1063	México	Silvestre	17.0047	-95.0122	87	MI
JMC1158	México	Silvestre	17.8828	-94.8125	13	MI
JMC1168	México	Silvestre	19.5997	-96.3983	6	MI
JMC1175	México	Silvestre	20.4328	-97.3747	102	MI
JMC1061	México	Domesticado	21.0023	99.0043	70	MII

G25608	México	Domesticado	17	-92.8833	1200	MII
G25570	México	Domesticado	-	-	-	MII
G25289	México	domesticado	16.45N	93.07	535	MI
G26739	México	Silvestre	16.0333	-93.7	40	MI
G25218	México	Silvestre	-	-	1800	MI
G26359	México	Silvestre	18.65	-98.4833	-	MI
G26360	México	Silvestre	18.44	98.27	1600	MI
G25706A	México	Silvestre	19.25	89.42	100	MI
JMC1-C.Rojo	México	Domesticado	19.8456	-90.5239	7	MI
ITZINTÉ	México	Silvestre	21.0600	-88.0409	12	MI
JMC20-Bolnchen	México	Silvestre	19.8472	-90.4867	41	MI
JMC21-Chunchintok	México	Silvestre	19.3583	-89.59	136	MI
JMC1176	México	Silvestre	18.73	92.42	1	MI
G25714A	México	Silvestre	18.62	-92.1119	1	MI
NOCAS	México	Silvestre	19.4205	-88.1622	25	MI
KIT-S	México	Silvestre	19.4944	-88.9944	25	MI
HOLPAT	México	Silvestre	19.3916	-88.0741	25	MI
BALAMPACH	México	domesticado	-	-	-	MI
JMC20-Bacalar	México	domesticado	18.7108	-88.3672	8	MI
JMC4-Kan-Sn Silverio	México	Domesticado	20.3583	-88.0275	10	MI
JMC24-Hazil	México	Domesticado	21.1375	-86.8528	8	MI
JMCH-Ekbalam	México	Domesticado	20.1219	-89.0653	38	MI
JMCK-Xoy	México	Domesticado	20.1228	-88.9708	37	MI
JMC3-Xocen	México	Domesticado	20.5997	-88.1633	24	MI
JMC10-Xohuayan 10	México	Silvestre	20.3017	-89.4181	50	MI
JMC11-Nocacab	México	Silvestre	20.9792	-87.6408	21	MI
JMC12-Xohuayan 12	México	Silvestre	20.1683	-89.3847	50	MI
JMC1156	México	Silvestre	18.3236	-93.1919	6	MI
JMC1155	México	Silvestre	18.1539	-93.2611	5	MI
ACOSTA-13-S	México	Silvestre	21.4450	-99.6355	560	MI
JMC1174	México	Silvestre	22.5514	-99.0783	214	MI