

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LA DOMESTICACIÓN DEL FRÍJOL LIMA  
(*Phaseolus lunatus* L.) EN AMÉRICA LATINA**

**JENNY ROCIO MOTTA ALDANA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BUCARAMANGA**

**2008**

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LA DOMESTICACIÓN DEL FRÍJOL LIMA  
(*Phaseolus lunatus* L.) EN AMÉRICA LATINA**

**JENNY ROCIO MOTTA ALDANA**

**Directora**

**Maria Isabel Chacón Sánchez**

**Co-director**

**Jorge Hernández Torres**

**Proyecto de grado para optar el título de  
BIÓLOGA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BUCARAMANGA**

**2008**

## **AGRADECIMIENTOS**

Expresamos nuestra gratitud al Banco de la República de Colombia y a la Dirección de Investigaciones Facultad de Ciencias (DIF) de la Universidad Industrial de Santander (UIS), por su contribución económica para la consecución de este proyecto de Investigación. Al CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) por proveernos el material vegetal utilizado en este estudio. A Genis Andres Castillo por su apoyo técnico y logístico en el desarrollo del proyecto, y al Dr. Daniel Debouck del CIAT por las valiosas discusiones sobre los resultados.

## CONTENIDO

	pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
<b>1. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
1.1 OBJETIVO GENERAL	17
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>19</b>
2.1. OBJETIVO ESPECÍFICO 1	19
2.1.1. Material Vegetal y Extracción de ADN.	19
2.1.2. Amplificaciones por PCR del ADN cloroplástico y nuclear.	25
2.1.3. Purificación de productos PCR.	27
2.1.4. Secuenciación de ADN.	27
2.1.5. Selección de Regiones Informativas del ADNcp e ITS/5.8S.	28
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO 2: EVENTOS DE DOMESTICACIÓN EN <i>P. LUNATUS</i> L.	28
2.3. OBJETIVO ESPECÍFICO 3: EFECTO FUNDADOR DE LA DOMESTICACIÓN Y ESTRUCTURA POBLACIONAL	29
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>31</b>
3.1 ESTUDIO PILOTO: DESARROLLO DE MARCADORES DEL ADNCP E ITS/5.8S POLIMÓRFICOS E INFORMATIVOS PARA ESTUDIOS DE DOMESTICACIÓN EN EL FRÍJOL LIMA SILVESTRE	31
3.2 EVENTOS DE DOMESTICACIÓN EN <i>P. LUNATUS</i> L.	33
3.2.1 DNAcP.	33

<b>3.2.2 ITS.</b>	<b>39</b>
<b>3.3. EFECTO FUNDADOR DE LA DOMESTICACIÓN Y ESTRUCTURA POBLACIONAL</b>	<b>42</b>
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>48</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>50</b>

## LISTA DE TABLAS

	pág.
<b>Tabla 1. Pasaporte y Distribución geográfica de <i>P. lutanus</i> y especies afines Silvestres y domesticadas proporcionadas por el Banco de Germoplasma de CIAT.</b>	<b>20</b>
<b>Tabla 2. Estudio piloto de variación genética del ADNcp y del ITS/5.8S. Número de bases secuenciadas, sitios polimórficos y diversidad nucleotídica en <i>P. lunatus</i>.</b>	<b>26</b>
<b>Tabla 3. Distribución geográfica de entradas de germoplasma del frijol lima silvestre y domesticado de los acervos genéticos Andino y Mesoamericano.</b>	<b>37</b>
<b>Tabla 4. Distribución geográfica de entradas de germoplasma del frijol lima silvestre y domesticado de los acervos genéticos Andino y Mesoamericano.</b>	<b>40</b>
<b>Tabla 5. Análisis de diversidad genética ADNcp (<i>atpB</i> – <i>rbcl</i> y <i>trnL</i> – <i>trnF</i>) y la región ITS/5.8S del frijol lima domesticado y silvestre de los acervos Mesoamericano MI y Andino AI.</b>	<b>43</b>
<b>Tabla 6. Diferenciación genética y flujo génico entre los acervos genéticos de <i>P. lunatus</i> silvestre y domesticado.</b>	<b>45</b>

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1. Tipo y tamaños de semilla de frijoles silvestres y domesticados de los acervos Mesoamericano y Andino.</b>	<b>14</b>
<b>Figura 2. Topología NJ del ADNcp para <i>P. lunatus</i> silvestre (W) y domesticado (D). (pag siguiente)</b>	<b>33</b>
<b>Figura 3. Topología NJ del ITS/5.8S para <i>P. lunatus</i> silvestre (W) y domesticado (D).</b>	<b>36</b>
<b>Figura 4. Distribución geográfica de entradas de germoplasma del frijol lima silvestre y cultivado de los acervos genéticos Mesoamericano MI y Andino AI.</b>	<b>38</b>
<b>Figura 5. Distribución geográfica de entradas de germoplasma del frijol lima silvestre y cultivado de los acervos genéticos Mesoamericano MI y Andino AI.</b>	<b>40</b>

## RESUMEN

**TITULO\*:** **CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LA DOMESTICACIÓN DEL FRÍJOL LIMA (*Phaseolus lunatus* L.) EN AMÉRICA LATINA.**

**AUTOR:** **JENNY ROCIO MOTTA ALDANA\*\***

**PALABRAS CLAVE:** **DOMESTICACIÓN, PHASEOLUS LUNATUS L., CPADN, ITS/5.8S, DIVERSIDAD GENÉTICA, ESTRUCTURA POBLACIONAL, EFECTO FUNDADOR.**

### DESCRIPCIÓN

El frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) es la segunda especie del género *Phaseolus* de mayor importancia económica. Esta formada por dos acervos genéticos silvestres, un acervo genético Andino de semillas grandes que se distribuye por la pendiente occidental de los Andes en Ecuador y norte del Perú y el acervo genético Mesoamericano de semillas pequeñas de amplia distribución que va desde México a lo largo de la pendiente oriental de los Andes hasta Salta, Argentina. En este estudio se desarrollaron marcadores moleculares del ADNcp (los espaciadores intergénicos atpB-rbcL, trnF-trnL) y ADNn (espaciador intergénico transcrito del ADN ribosomal ITS/5.8S) para establecer los patrones de domesticación de los cultigrupos Mesoamericanos de semilla pequeña "Sieva" y "Potato" y del cultigrupo Andino de semillas grandes "Big Lima", así como para evaluar la diversidad genética, el efecto fundador debido a la domesticación y la estructura poblacional del frijol lima silvestre y domesticado. Con los resultados de nuestro estudio se confirmó el primer evento de domesticación que originó al cultigrupo "Big Lima" de semilla grande en Ecuador y norte de Perú, y se sugiere un segundo evento de domesticación a partir de semillas de tamaño pequeño en tierras Mexicanas al occidente y el nor-occidente del Istmo de Tehuantepec, sin distinguirse los morfotipos "Sieva y Potato" propuestos por Baudet en 1977 como grupos naturales. Se detectó una reducción drástica en diversidad genética en cada uno de estos dos eventos de domesticación, con una mayor reducción para el acervo Andino (alrededor del 68%) que para el Mesoamericano (46%). Se observó un alto grado de diferenciación genética entre los acervos del ADNcp Andino (AI) y Mesoamericano (MI) con valores de  $N_{ST} = 0.990$ , también observado en el ITS/5.8S con un valor de  $N_{ST} = 0.861$ , los cuales indican altos niveles de subdivisión poblacional. La estimación del número de migrantes entre los dos acervos ( $N_m$ ) muestra un escenario de flujo génico restringido para el ADNcp e ITS/5.8S. Es importante el conocimiento de la estructura genética actual de nuestros cultivos para el manejo del germoplasma vegetal y las actividades de mejoramiento, puesto que existe una disminución de la variabilidad genética en los genomas cultivados como resultado de la domesticación, por tal motivo es importante mantener y conservar la única fuente de variabilidad genética que esta presente en los acervos genéticos Andino y Mesoamericanos en el frijol lima silvestre.

---

\* Proyecto de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Maria Isabel Chacón Sánchez PhD.  
Codirector: Jorge Hernández Torres PhD.

## ABSTRACT

**TITLE\*:** CONTRIBUTION TO STUDY OF THE DOMESTICATION OF LIMA BEAN (*Phaseolus lunatus* L.) IN LATIN AMERICA.

**AUTOR:** JENNY ROCIO MOTTA ALDANA\*\*

**KEY WORDS:** DOMESTICATION, PHASEOLUS LUNATUS L., CPDNA, ITS/5.8S, GENETIC DIVERSITY, POPULATION STRUCTURE, FOUNDER EFFECT.

### DESCRIPTION

The lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is economically the second most important species of the genus *Phaseolus*. As wild, this species consists of two gene pools, an Andean gene pool of large seeds that occurs on the western slope of the Andes in Ecuador-northern Peru, and a Mesoamerican gene pool with smaller seeds of broad distribution from Mexico to Salta, Argentina, on the eastern slope of the Andes. In the present study, nuclear (internal transcribed spacer of the ribosomal DNA ITS/5.8S) and chloroplast (intergenic spacers *atpB-rbcL* and *trnL-trnF*) DNA molecular markers were developed in order to establish the patterns of domestication of the small-seeded Mesoamerican cultigroups "Sieva" and "Potato" and the large-seeded Andean cultigroup "Big Lima", as well as to assess the genetic diversity, the founder effect due to domestication and the population structure of wild and domesticated lima beans. Our results confirm the first event that led to the domestication of the cultigroup "Big Lima" in Ecuador-northern Peru and also suggest a second event of domestication from small-seeded populations in Mexican lands, specially to the west and the north-west of the Isthmus of Tehuantepec, for the Mesoamerican cultigroups, without distinction of the morphotypes "Sieva" and "Potato" proposed by Baudet in 1977 as natural groups. We found a drastic reduction in genetic diversity in each of these two events of domestication, with a higher reduction in the Andean pool (around 68%) than in the Mesoamerican pool (46%). A high degree of genetic differentiation was found among the Andean (A1) and Mesoamerican (M1) gene pools with values of NST = 0.990 for cpDNA and of NST = 0.861 for ITS/5.8S, which indicated high levels of population subdivision. The number of migrants estimated ( $N_m$ ) between the two gene pools shows a scenario of restricted gene flow for both, the cpDNA and ITS/5.8S. It is important to know the current genetic structure of our crops for germplasm management and breeding activities, since there may have been a reduction of genetic variability in their genomes as a result of domestication. For this reason, it is also important to maintain and conserve the unique genetic variability that may present in the Andean and Mesoamerican wild gene pools in lima beans.

---

\* Degree Project

\*\* Science Faculty. Biology Department. Advisors: Maria Isabel Chacón Sánchez PhD, Jorge Hernández Torres PhD.

## INTRODUCCIÓN

La domesticación en plantas y animales es el desarrollo más importante en los últimos 10.000-13.000 años de la historia humana, ya que fue un prerrequisito para el surgimiento de la civilización, transformando la demografía global (Diamond, 2002; Harlan, 1992; Kupzow, 1980). Ocurrió en varias regiones independientemente, al menos seis regiones de domesticación en el mundo han sido identificadas, incluyendo Mesoamérica, el sur de los Andes, el Cercano Oriente, África (probablemente Sahel y las regiones montañosas de Etiopía), el Sudeste de Asia, y China (Harlan, 1992).

La domesticación es el proceso evolutivo mediante el cual se originaron las plantas cultivadas, y durante éste, las poblaciones silvestres se adaptaron al medio ambiente y a las prácticas de cultivo creadas por el hombre (Harlan, 1992). Las plantas inicialmente seleccionadas para cultivo fueron indistinguibles de sus parientes silvestres, y una vez establecida la agricultura los humanos eligieron rasgos de interés, básicos para una siembra y producción más efectiva, con los cuales las plantas cultivadas divergieron de sus ancestros silvestres.

Este gran número de rasgos morfológicos y fisiológicos que diferencian las plantas domesticadas de sus ancestros silvestres, son características colectivamente llamadas el síndrome de la domesticación, que incluyen cambios en la arquitectura de la planta por ejemplo, incremento en el tamaño de las semillas o frutos, reducción del mecanismo de dispersión de las semillas, retención de semillas o frutos maduros sobre la planta, reducción de la dormancia, sincronización en la germinación, entre otros (Doebley, 1992; Harlan, 1992; Zohary, 2004). Se piensa que muchos de los rasgos seleccionados bajo domesticación son deletéreos en las poblaciones silvestres, y como consecuencia, las plantas completamente

domesticadas no pueden sobrevivir sin la intervención humana para su siembra y cosecha (Harlan, 1995; Gepts, 2002; Pickersgill, 2007).

Para la mayoría de las especies domesticadas se ha reportado una reducción de la diversidad genética con respecto a sus parientes silvestres, esto se conoce como el efecto fundador de la domesticación, que es debido a que pocas plantas silvestres fueron seleccionadas como las fundadoras de las nuevas poblaciones cultivadas (Ladizinsky, 1998).

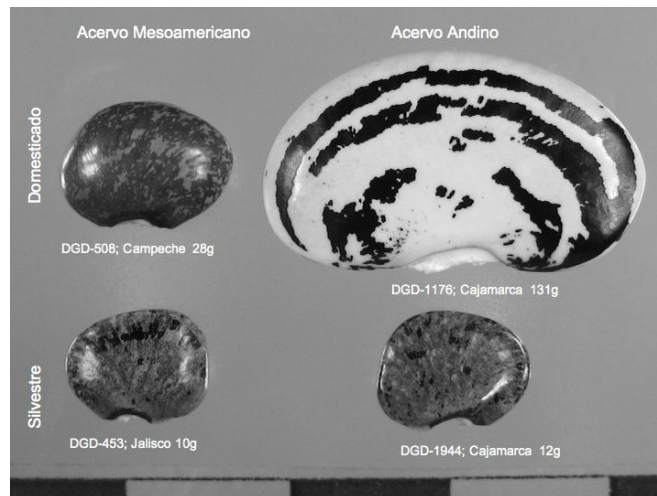
Muchos de nuestros cultivos (ej. el café, la cebada, la arveja, las lentejas, la avena y los garbanzos) se originaron a partir de un evento de domesticación único en un área geográfica definida, mientras que otros son el producto de domesticaciones múltiples ya sea en el espacio o en el tiempo (Harlan, 1975). Los parientes silvestres de las especies domesticadas que poseen una amplia distribución geográfica probablemente han sido domesticados más de una vez ya que el hombre tiende a ser atraído por la misma clase de plantas y animales en cualquier lugar (Harlan, 1976).

Existen muy pocas especies en donde se ha documentado eventos de domesticación múltiples. Dos de estas especies pertenecen al género *Phaseolus*, de origen americano, y son *P. vulgaris* L. (el frijol común) y *P. lunatus* L. (el frijol lima). En el frijol común, al menos una domesticación ocurrió en Mesoamérica a partir de frijoles silvestres de semilla pequeña y otra ocurrió en la región centro-sur de los Andes a partir de frijoles silvestres de semilla grande (Chacón *et al.*, 2005; Gepts, 1997; Khairallah *et al.*, 1992). Cada una de estas domesticaciones dio origen al menos a tres razas que se diferencian por sus características bioquímicas, morfo-agronómicas, adaptaciones ecológicas y distribución geográfica (Beebe *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 1991). Del mismo modo, para el frijol lima existe un estudio enfocado en la historia evolutiva de la especie bajo

domesticación, el cual ha propuesto al menos dos centros de domesticación (Fofana *et al.*, 2001).

Al parecer el frijol lima silvestre fue domesticado al menos dos veces y de forma independiente. Un evento de domesticación en el área del sur de Ecuador-Norte del Perú habría dado origen al cultigrupo andino conocido como “Big Lima” que se caracteriza por un tamaño grande y forma aplanada de la semilla. Un segundo evento de domesticación probablemente ocurrió en alguna región de Mesoamérica, Centroamérica o de las islas Caribeñas y habría dado origen a los cultigrupos mesoamericanos conocidos como “Sieva” y “Potato” que se caracterizan por un tamaño menor y forma redondeada de la semilla (Fofana *et al.*, 2001) (ver Figura 1). El lugar de domesticación de estos dos cultigrupos mesoamericanos es aún desconocido y no se ha establecido si estos cultigrupos se originaron o no a partir de eventos de domesticación separados.

**Figura 1. Tipo y tamaños de semilla de frijoles silvestres y domesticados de los acervos Mesoamericano y Andino.**



Note cómo a partir de frijoles silvestres de tipos y tamaños de semillas similares (uno de Jalisco, México y otro de Cajamarca, Perú) se originaron tipos de semillas domesticadas muy diferentes. Foto cortesía de Daniel Debouck, CIAT.

El género *Phaseolus* tiene de 50 a 60 especies silvestres de origen Americano y solamente cinco han sido domesticadas: *P. vulgaris*, *P. dumosus*, *P. coccineus*, *P. acutifolius* y *P. lunatus*, cada especie domesticada constituye un acervo genético con su forma ancestral silvestre (Caicedo *et al.*, 1999; Delgado-Salinas *et al.*, 1999). El frijol lima (*P. lunatus* L.), es una leguminosa tropical comestible caracterizada por su alta diversidad genética y rendimiento potencial, siendo entre las especies cultivadas del género, la segunda después de *P. vulgaris* (Maquet *et al.*, 1999).

*P. lunatus* ha sido subdividido en dos variedades botánicas, var. *silvester* y var. *lunatus* (Baudet, 1977), que corresponde al tipo silvestre y domesticado, respectivamente. El frijol lima silvestre presenta una distribución geográfica amplia en las Américas, que va desde Sinaloa (México) hasta Salta (Argentina) en regiones bajas y altas. Tradicionalmente, dentro de la diversidad del frijol lima silvestre se han identificado dos acervos genéticos principales, los cuales han sido llamados el acervo Mesoamericano y el acervo Andino según la definición de Gepts (1988). Estos acervos se diferencian por su tamaño de semilla contrastante (Debouck *et al.*, 1987), características bioquímicas (Gutiérrez Salgado *et al.*, 1995; Maquet *et al.*, 1999) y marcadores moleculares, como AFLP y polimorfismos del ADN del cloroplasto (ADNcp) (Caicedo *et al.*, 1999; Fofana *et al.*, 1999, Fofana *et al.*, 2001). El acervo con semillas pequeñas, llamado Mesoamericano, es ampliamente distribuido en Mesoamérica y Suramérica, principalmente sobre los 1.600 msnm. En Suramérica, este acervo se distribuye desde Colombia, hacia el sur, por la pendiente oriental de los Andes. El acervo genético denominado Andino, con tamaño de semilla mayor, ocurre en Ecuador y norte de Perú, en valles intra-andinos, generalmente distribuido sobre los 1.800 msnm (Debouck, 1996). Recientemente, Serrano (2008) propuso sobre la base de análisis filogeográficos y de estructura poblacional del frijol lima silvestre la existencia de tres acervos genéticos, el acervo andino (AI) y dos acervos mesoamericanos (MI y

MII), los cuales presentan en general diferentes rangos geográficos y una alta divergencia genética. El acervo AI se encuentra distribuido en la vertiente occidental de los Andes de Ecuador y norte del Perú, el acervo MI se distribuye en México principalmente al norte y al noroccidente del Istmo de Tehuantepec y el acervo MII ocurre en Centro América (principalmente al sur y suroriente del Istmo de Tehuantepec), el Caribe, Colombia y en la vertiente oriental de los Andes.

Los estudios de la domesticación de plantas se han beneficiado de la aplicación de marcadores moleculares mediante análisis comparativos entre los cultivos y sus progenitores silvestres. Tanto marcadores del ADN nuclear (Becerra Velásquez and Gepts, 1994; Buckler and Holtsford, 1996; Heun *et al.*, 1997; Hilton and Gaut, 1998) como del ADNcp (Anderson *et al.*, 1996; Clegg *et al.*, 1984; Hosaka and Hanneman, 1988; Palmer *et al.*, 1983) han sido muy útiles para estudiar el centro de origen de las plantas cultivadas. Los datos de secuencia de algunas porciones de genes de copia única del ADN nuclear y de algunas regiones espaciadoras y de intrones del ADNcp han sido muy útiles para el estudio de los centros de domesticación de algunos cultivos Neotropicales (Chacón, 2001; Chacón *et al.*, 2005; Olsen and Schaal, 1999). El ADNcp es una fuente muy útil para reconstruir las filogenias intraespecíficas en plantas. Existen cebadores universales que permiten la fácil amplificación por PCR de regiones no-codificadoras del genoma del cloroplasto. Se ha visto que estas regiones varían dentro y entre especies (Chacón *et al.*, 2005; Fofana *et al.*, 1997; Schaal *et al.*, 1998, Xu *et al.*, 2000). El ADNcp es heredado uniparentalmente en la mayoría de las especies vegetales y a través de la madre en casi todas las Angiospermas (Soltis *et al.*, 1992, Birky, 1995), incluyendo el género *Phaseolus* (Corriveau and Coleman, 1988), lo cual probablemente evita que los linajes del cloroplasto se vean afectados por eventos de recombinación.

## **1. OBJETIVOS**

En el presente proyecto se propuso el estudio de la estructura genética y la historia bajo domesticación del fríjol lima en el continente Americano, en especial establecer el origen de las formas domesticadas mesoamericanas, mediante el uso de marcadores moleculares del ADNcp y del núcleo en una muestra representativa de fríjol lima silvestre y domesticado utilizando las herramientas de la genética de poblaciones.

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

Establecer los patrones de domesticación del fríjol lima (*Phaseolus lunatus* L.) y el origen de los cultigrupos mesoamericanos y andino a través de marcadores moleculares del genoma cloroplástico y del núcleo.

### **1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desarrollar marcadores moleculares del ADNcp y del núcleo que sean polimórficos e informativos para el estudio de domesticación en el fríjol lima silvestre.
- Determinar los posibles patrones de domesticación del fríjol lima mediante el análisis de las relaciones genéticas entre haplotipos silvestres y domesticados de fríjol lima y su distribución geográfica.

- Establecer el efecto fundador de la domesticación y la estructura poblacional de *P. lunatus* silvestre y domesticado.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. OBJETIVO ESPECÍFICO 1

**Estudio Piloto. Desarrollo de marcadores del ADNcp y del ADN nuclear (ADNn) polimórficos e informativos para estudios de domesticación en el fríjol lima silvestre.**

Una de las principales limitaciones de los estudios filogenéticos, filogeográficos y de domesticación en plantas es la ausencia de marcadores moleculares apropiados, tanto del genoma cloroplástico como del nuclear (Schaal and Olsen, 2000; Hare, 2001). El objetivo de esta fase fue identificar marcadores moleculares promisorios en fríjol lima silvestre a partir de una muestra representativa de entradas de germoplasma de los dos acervos genéticos (Mesoamericano y Andino) del fríjol lima silvestre y algunas especies aliadas. Para ello se desarrolló un estudio piloto con once regiones no codificantes del genoma cloroplástico (ADNcp) y una región nuclear (ADNn) con el fin de detectar variación intraespecífica (polimorfismos).

**2.1.1. Material Vegetal y Extracción de ADN.** Dentro del estudio piloto se incluyeron 28 entradas de fríjol lima silvestre y seis especies cercanas, tres de ellas provenientes de Suramérica (*P. augusti*, *P. pachyrrhizoides* y *P. bolivianus*) y tres especies de Mesoamérica (*P. novoleonensis*, *P. leptostachyus* y *P. marechalii*) (ver entradas marcadas con asterisco en la Tabla 1). Las entradas de fríjol lima se seleccionaron cuidando que sus datos de pasaporte y distribución geográfica se encontraran completos. Todo el material vegetal usado en este estudio proviene del Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT en Cali,

Colombia (Tabla 1) para lo cual se firmó un Acuerdo de Transferencia de Material (ATM).

**Tabla 1. Pasaporte y Distribución geográfica de *P. lutanus* y especies afines Silvestres y domesticadas proporcionadas por el Banco de Germoplasma de CIAT.**

Número G- CIAT	Especie	País	Departamento	Altitud	Estado Biológico
G40716*	<i>P. augusti</i>	ARG	TUCUMAN	1520	Silvestre
G40746*	<i>P. bolivianus</i>	BOL	COCHABAMBA	2830	Silvestre
	<i>P.</i>				Silvestre
G40590*	<i>novoleonensis</i>	MEX	NUEVO LEON	2830	
G40598*	<i>P.</i>	CRI	SAN JOSE	1210	Silvestre
	<i>leptostachyus</i>				
G40506*	<i>P. marechalli</i>	MEX	MORELOS	-	Silvestre
	<i>P.</i>				Silvestre
	<i>pachyrrhizoide</i>				
G40717*	<i>s</i>	PER	JUNIN	2390	
G26685*	<i>P. lunatus</i>	ARG	SALTA	650	Silvestre
G26404*	<i>P. lunatus</i>	ARG	CHACO	-	Silvestre
G26749*	<i>P. lunatus</i>	ARG	JUJUY	-	Silvestre
G25233	<i>P. lunatus</i>	BLZ	CAYO DISTRICT	40	Silvestre
G25819*	<i>P. lunatus</i>	COL	MAGDALENA	580	Silvestre
G26309	<i>P. lunatus</i>	COL	MAGDALENA	50	Silvestre
G26515*	<i>P. lunatus</i>	COL	ATLANTICO	45	Silvestre
G26527	<i>P. lunatus</i>	COL	CORDOBA	70	Silvestre
G26530*	<i>P. lunatus</i>	COL	BOYACA	1600	Silvestre
G26618A	<i>P. lunatus</i>	COL	BOYACA	1440	Silvestre

<b>Número G- CIAT</b>	<b>Especie</b>	<b>País</b>	<b>Departamento</b>	<b>Altitud</b>	<b>Estado Biológico</b>
G26687	<i>P. lunatus</i>	COL	CUNDINAMARCA	1680	Silvestre
G26704*	<i>P. lunatus</i>	COL	CALDAS	1485	Silvestre
G25227	<i>P. lunatus</i>	CRI	HEREDIA	1100	Silvestre
G25385A*	<i>P. lunatus</i>	CRI	SAN JOSE	1171	Silvestre
G25584A*	<i>P. lunatus</i>	CRI	GUANACASTE	100	Silvestre
G25963	<i>P. lunatus</i>	CRI	SAN JOSE	1450	Silvestre
G25966	<i>P. lunatus</i>	CRI	CARTAGO	1320	Silvestre
G26726	<i>P. lunatus</i>	CRI	ALAJUELA	1280	Silvestre
G26727	<i>P. lunatus</i>	CRI	PUNTA ARENAS	1100	Silvestre
G25294C*	<i>P. lunatus</i>	CUB	MATANZAS	3	Silvestre
G26459*	<i>P. lunatus</i>	ECU	LOJA	1580	Silvestre
G26468*	<i>P. lunatus</i>	ECU	BOLIVAR	870	Silvestre
G26469	<i>P. lunatus</i>	ECU	IMBADURA	1390	Silvestre
G26606*	<i>P. lunatus</i>	ECU	CHIMBORAZO	1550	Silvestre
G26608	<i>P. lunatus</i>	ECU	EL ORO	800	Silvestre
G26609	<i>P. lunatus</i>	ECU	AZUAY	1570	Silvestre
G26721	<i>P. lunatus</i>	ECU	AZUAY	470	Silvestre
G26751A*	<i>P. lunatus</i>	ECU	PICHINCHA	1740	Silvestre
G25273A*	<i>P. lunatus</i>	SLV	AHUACHAPAN	754	Silvestre
G25222*	<i>P. lunatus</i>	GTM	ZACAPA	50	Silvestre
G25272	<i>P. lunatus</i>	GTM	SANTA ROSA	893	Silvestre
G25911*	<i>P. lunatus</i>	GTM	RETALHULEU	240	Silvestre
G25912*	<i>P. lunatus</i>	GTM	SACATEPEQUEZ	1400	Silvestre
G25977	<i>P. lunatus</i>	GTM	ESCUINTLA	490	Silvestre
G26508*	<i>P. lunatus</i>	GTM	PETEN	150	Silvestre
			HUEHUETENANG		Silvestre
G26653	<i>P. lunatus</i>	GTM	O	590	

<b>Número G- CIAT</b>	<b>Especie</b>	<b>País</b>	<b>Departamento</b>	<b>Altitud</b>	<b>Estado Biológico</b>
G26683	<i>P. lunatus</i>	GTM	QUEZALTENANGO	1750	Silvestre
G26628*	<i>P. lunatus</i>	HND	EL PARAISO	840	Silvestre
G26629	<i>P. lunatus</i>	HND	OLANCHO	550	Silvestre
G26631*	<i>P. lunatus</i>	HND	YORO	210	Silvestre
G26632	<i>P. lunatus</i>	HND	SANTA BARBARA	260	Silvestre
G26633	<i>P. lunatus</i>	HND	COPAN	860	Silvestre
G25228*	<i>P. lunatus</i>	MEX	NAYARIT	600	Silvestre
G25230*	<i>P. lunatus</i>	MEX	COLIMA	3	Silvestre
G25704*	<i>P. lunatus</i>	MEX	JALISCO	1390	Silvestre
G25713A*	<i>P. lunatus</i>	MEX	CAMPECHE	100	Silvestre
G25785	<i>P. lunatus</i>	MEX	CAMPECHE	140	Silvestre
G25816	<i>P. lunatus</i>	MEX	YUCATAN	30	Silvestre
G25843	<i>P. lunatus</i>	MEX	MORELOS	900	Silvestre
G25851	<i>P. lunatus</i>	MEX	MORELOS	1250	Silvestre
G26360*	<i>P. lunatus</i>	MEX	PUEBLA	1600	Silvestre
G26516	<i>P. lunatus</i>	MEX	CHIAPAS	40	Silvestre

<b>Número G- CIAT</b>	<b>Especie</b>	<b>País</b>	<b>Departamento</b>	<b>Altitud</b>	<b>Estado Biológico</b>
G26518	<i>P. lunatus</i>	MEX	GUERRERO	240	Silvestre
G26535	<i>P. lunatus</i>	MEX	CHIAPAS	1160	Silvestre
G26541	<i>P. lunatus</i>	MEX	PUEBLA	820	Silvestre
G26741	<i>P. lunatus</i>	MEX	OAXACA	20	Silvestre
G25913*	<i>P. lunatus</i>	PER	CAJAMARCA	3	Silvestre
G26348	<i>P. lunatus</i>	PER	CAJAMARCA	1100	Silvestre
G26547*	<i>P. lunatus</i>	PER	JUNIN	980	Silvestre

G25236	<i>P. lunatus</i>	ARG	BUENOS AIRES	1100	Domesticado
G25540	<i>P. lunatus</i>	ARG	SALTA	1143	Domesticado
G25543	<i>P. lunatus</i>	ARG	SANTIAGOESTERO	199	Domesticado
G26290	<i>P. lunatus</i>	ARG	FORMOSA	200	Domesticado
G25981	<i>P. lunatus</i>	BOL	COCHABAMBA	2190	Domesticado
G25983	<i>P. lunatus</i>	BOL	CHUQUISACA	1970	Domesticado
G25987	<i>P. lunatus</i>	BOL	CHUQUISACA	2010	Domesticado
G27337	<i>P. lunatus</i>	BOL	LA PAZ	800	Domesticado
G25108	<i>P. lunatus</i>	BRA	PARANA	1035	Domesticado
G26002	<i>P. lunatus</i>	BRA	PIAUI	200	Domesticado
G26044	<i>P. lunatus</i>	BRA	SERGIPE	53	Domesticado
G26109	<i>P. lunatus</i>	BRA	ESPIRITO SANTO	1000	Domesticado
G26146	<i>P. lunatus</i>	BRA	RIO G. DO SUL	7	Domesticado
G26211	<i>P. lunatus</i>	BRA	MATO GROSSO	127	Domesticado
G26227	<i>P. lunatus</i>	BRA	SAO PAULO	855	Domesticado
G25910	<i>P. lunatus</i>	COL	PUTUMAYO	2040	Domesticado
G26498	<i>P. lunatus</i>	COL	TOLIMA	1300	Domesticado
G26656	<i>P. lunatus</i>	COL	ANTIOQUIA	1800	Domesticado
G26706	<i>P. lunatus</i>	COL	CALDAS	1740	Domesticado
G26744	<i>P. lunatus</i>	COL	VALLE del CAUCA	1150	Domesticado
G26745	<i>P. lunatus</i>	COL	VALLE del CAUCA	1150	Domesticado
G26748	<i>P. lunatus</i>	COL	VALLE del CAUCA	1150	Domesticado
G25393	<i>P. lunatus</i>	CRI	SAN JOSE	1171	Domesticado
G25538	<i>P. lunatus</i>	CRI	ALAJUELA	940	Domesticado
G25295	<i>P. lunatus</i>	CUB	MATANZAS	3	Domesticado
G25298	<i>P. lunatus</i>	CUB	ISLA de JUVENTUD	67	Domesticado
G27289	<i>P. lunatus</i>	CUB	CIEGO DE AVILA	10	Domesticado
G26259	<i>P. lunatus</i>	ECU	NAPO	219	Domesticado
G25410	<i>P. lunatus</i>	ECU	PICHINCHA	2840	Domesticado
G26480	<i>P. lunatus</i>	ECU	AZUAY	470	Domesticado

G26659	<i>P. lunatus</i>	ECU	CHIMBORAZO	2300	Domesticado
G26672	<i>P. lunatus</i>	ECU	CARCHI	1660	Domesticado
G25254	<i>P. lunatus</i>	GTM	ESCUINTLA	1790	Domesticado
G25285	<i>P. lunatus</i>	GTM	JALAPA	1362	Domesticado
G26302	<i>P. lunatus</i>	GTM	CHIMALTENANGO	1700	Domesticado
G26441	<i>P. lunatus</i>	GTM	CHIQUIMULA	700	Domesticado
G25289	<i>P. lunatus</i>	MEX	CHIAPAS	535	Domesticado
G25717	<i>P. lunatus</i>	MEX	CAMPECHE	100	Domesticado
G25971	<i>P. lunatus</i>	MEX	CHIAPAS	2127	Domesticado
G26164	<i>P. lunatus</i>	MEX	MORELOS	1850	Domesticado
G25420	<i>P. lunatus</i>	PER	TUMBES	6	Domesticado
G25577	<i>P. lunatus</i>	PER	LORETO	116	Domesticado
G25826	<i>P. lunatus</i>	PER	CAJAMARCA	2620	Domesticado
G25909	<i>P. lunatus</i>	PER	AMAZONAS	2000	Domesticado
G26029	<i>P. lunatus</i>	PER	ICA	598	Domesticado
G27332	<i>P. lunatus</i>	PER	ANCASH	1980	Domesticado
G25277	<i>P. lunatus</i>	SLV	AHUACHAPAN	754	Domesticado
G25361	<i>P. lunatus</i>	SLV	LA PAZ	170	Domesticado
G25366	<i>P. lunatus</i>	SLV	LA LIBERTAD	965	Domesticado
G25367	<i>P. lunatus</i>	SLV	SANTA ANA	400	Domesticado

ARG: Argentina, BLZ: Belice, BRA= Brasil, COL: Colombia, CRI: Costa Rica, CUB: Cuba, ECU: Ecuador, GTM: Guatemala, HND: Honduras, MEX: México, PER: Perú, SLV: El Salvador. \* = Entradas usadas en el estudio piloto. La altitud está dada en metros sobre el nivel del mar.

En cajas de Petri se germinaron cinco semillas por entrada, se incubaron durante un periodo de 5-10 días a temperatura ambiente. En el momento que las plántulas se desarrollaron, se trasladaron a bolsas con mezcla de suelo fértil y se permitió el crecimiento, hasta el desarrollo de varios trifolios jóvenes para la colecta y almacenamiento en sílica gel a -20° C. La extracción de ADN se realizó según un protocolo mini CTAB estándar (Doyle *et al.*, 1987) y se almacenó a -20° C.

**2.1.2. Amplificaciones por PCR del ADN cloroplástico y nuclear.** Se realizó la evaluación de 9 regiones no codificantes del genoma cloroplástico (ADNcp) y el espaciador interno transcrito del ADN ribosomal (ITS/5.8S) ubicado en el genoma nuclear (ADNn) (Tabla 2). Las fuentes de los cebadores utilizados para las amplificaciones están reportadas en la Tabla 2. Estas regiones del ADNcp fueron escogidas porque han demostrado contener información útil a nivel intra-específico en diversas especies vegetales, incluyendo frijol (Asmussen and Liston, 1998, Bailey and Doyle, 1997, Bakker *et al.*, 1999, Chacón 2001, Chacón *et al.*, 1999, Demesure *et al.*, 1995, Dutech *et al.*, 2000, Hamilton, 1999, Small *et al.*, 1998, Taberlet *et al.*, 1991, Xu *et al.*, 2000). La región ITS/5.8S nuclear se seleccionó para este estudio porque ha mostrado utilidad para resolver relaciones intraespecíficas entre linajes de especies antiguas y/o de amplia distribución (Dick *et al.*, 2003).

**Tabla 2. Estudio piloto de variación genética del ADNcp y del ITS/5.8S. Número de bases secuenciadas, sitios polimórficos y diversidad nucleotídica en *P. lunatus*.**

Región	Tm (°C)	No. de bases secuenciadas	No. de sitios polimórficos				Diversidad Nucleotídica (Pi, π)		Fuente
			PI	PU	Intra	Inter	π <sub>intra</sub>	π <sub>inter</sub>	
<b>ADNcp</b>									
Rps14-	50	529	0	0	0	2	0.00000	0.00151	2
trnL	51	478	2	2	1	4	0.00139	0.00377	3
accD-	51	632	1	14	2	14	0.00213	0.00832	4
trnS-	51	605	6	17	7	18	0.00223	0.01043	5
atpB-	50	894	6	9	6	12	0.00294	0.00503	1
trnL-trnF	50	433	2	9	6	9	0.00431	0.01215	3
psbC-	50.5	633	8	5	9	9	0.00586	0.00681	2
trnT-trnL	50	657	5	18	11	20	0.00916	0.01329	3
petA-	50	332	6	11	8	13	0.01121	0.01436	2
<b>Total</b>		<b>5193</b>	<b>36</b>	<b>85</b>	<b>50</b>	<b>101</b>	<b>0.00436</b>	<b>0.00841</b>	
<b>ADNcp</b>									
<b>ITS / 5.8S</b>	<b>50</b>	<b>695</b>	<b>15</b>	<b>46</b>	<b>25</b>	<b>59</b>	<b>0.00817</b>	<b>0.02846</b>	<b>6</b>

Fuente: 1. Chiang *et al.*, (1998), 2. Fofana *et al.*, (1999), 3. Taberlet *et al.*, (1991), 4. Small *et al.*, (1998), 5. Hamilton (1999), 6. White *et al.*, (1990).

Diversidad intraespecífica se refiere a la diversidad dentro del frijol lima silvestre. PI: caracteres informativos bajo el criterio de parsimonia, PU: caracteres no informativos bajo el criterio de parsimonia, Intra: Intra-específico, Inter: Inter-específico. Fuente se refiere a la referencia bibliográfica de los cebadores utilizados para la amplificación por PCR. Los cebadores usados para la región ITS/5.8S son ITS1 e ITS4.

Las reacciones de amplificación por PCR contenían 0.5  $\mu$ M de cada cebador, 1X de Buffer (libre de Mg) para la Taq Polimerasa, 2.0 mM  $MgCl_2$ , 0.2 mM dNTPs, 1 unidad de Taq ADN polimerasa (Promega, Madison, USA) y 5-10 ng de ADN. Hubo variación en la concentración de  $MgCl_2$  para la amplificación de las siguientes regiones, 1.5 mM para la región espaciadora *psbC* – *tRNASer* y el intrón *trnL* y 2.5 mM para las regiones *petA* – *psbE*, *trnT* – *trnL* e ITS/5.8S.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un Termociclador PTC-100<sup>TM</sup> (MJ Reserch, Inc) bajo las siguientes condiciones: Hot star de 94°C por 4 min., 35 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 50°C-52°C (dependiendo de cada par de cebadores) y 2 min. a 72°C, por último, un ciclo de 10 min. de extensión del producto PCR a 72°C. Los productos PCR fueron visualizados por tinción con Bromuro de Etidio en geles de agarosa al 1% en 0.5X Buffer TBE.

Para evaluar la existencia de polimorfismos entre individuos pertenecientes a la misma entrada de germoplasma, se realizó amplificación por PCR de la secuencia ITS/5.8S en 20 individuos provenientes de cada una de dos entradas seleccionadas, una mesoamericana y una andina.

**2.1.3. Purificación de productos PCR.** Los productos PCR de cada región fueron purificados mediante el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System de Promega Corporation (Madison, WI, USA) según las instrucciones del fabricante. Cada fragmento purificado fue visualizado en geles de agarosa (1.5%) por tinción con Bromuro de Etidio en presencia de luz UV, su longitud y concentración fue estimada por comparación con un marcador de peso molecular (100 pb).

**2.1.4. Secuenciación de ADN.** Para la secuenciación de las regiones del ADNcp y ADNn se tomaron 15  $\mu$ l de producto PCR purificado en concentraciones mayores a 35 ng/ $\mu$ l. La secuenciación de los fragmentos se contrató con la

empresa Macrogen Inc. (Seoul, Korea) ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)), donde utilizaron un secuenciador ABI-3700.

Con el fin de evaluar la calidad del servicio de secuenciación prestado por Macrogen, se enviaron las regiones *rps14—psaB* y *petA—psbE* de *P. vulgaris* de secuencia conocida. Todas las regiones fueron secuenciadas en sentido 5'-3', excepto las regiones *petA – psbE*, *psbC–trnASer*, *trnT–trnL* y *atpB – rbcL* las cuales fueron secuenciadas en los sentidos 5'-3' y 3'-5', puesto que los fragmentos excedían los 800 pb, siendo ésta la capacidad de resolución del electroferograma. Las secuencias recibidas de los productos PCR fueron editadas con Bioedit, versión 5.0.6 (Hall 2001) y alineadas con el programa Muscle versión 3.6 (Edgar, 2004) a partir del cual se obtuvieron las matrices para los análisis de búsqueda de polimorfismos (SNPs) y diversidad nucleotídica.

**2.1.5. Selección de Regiones Informativas del ADNcp e ITS/5.8S.** Para la selección de regiones informativas del ADNcp e ITS/5.8S se evaluaron parámetros como el número de sitios polimórficos (SNPs) a nivel intra e inter específico, el contenido de caracteres informativos bajo el criterio de parsimonia (PI= se refiere a aquellos caracteres que son compartidos por al menos dos terminales) y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) (Nei and Millar, 1990) mediante el programa DNAsp (Rozas *et al.*, 2003), y por último, la amplificación en el total de las muestras para cada una de las regiones.

## **2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO 2: EVENTOS DE DOMESTICACIÓN EN *P. LUNATUS* L.**

Se realizó secuenciamiento de los espaciadores intergénicos *atpB-rbcL* y *trnL-trnF* del ADNcp y la región ITS/5.8S en una muestra de 50 entradas de germoplasma de frijol lima domesticado (Tabla 1), las cuales representan el rango de

distribución geográfica del fríjol lima domesticado y sus correspondientes acervos genéticos (Mesoamericano y Andino) representando las variedades “Sieva”, “Potato” y “Big Lima”. Las secuencias de los dos espaciadores intergénicos del ADNcp se trataron como un solo conjunto de datos en todos los análisis subsecuentes.

Con el fin de determinar los patrones de domesticación en fríjol lima, se evaluaron las relaciones genéticas entre los haplotipos del ADNcp y del ITS/5.8S entre fríjoles silvestres y domesticados. Para este fin se obtuvo una matriz de distancias genéticas bajo el modelo de sustitución nucleotídica de Jukes-Cantor (frecuencias nucleotídicas iguales y un solo tipo de sustitución). A partir de esta matriz se construyó un dendrograma utilizando el algoritmo de Neighbour-Joining (NJ) con el software PAUP\* (Swofford, 1998). El soporte de los grupos en el dendrograma se validó mediante análisis de bootstrap con 1000 réplicas. En esta y en las fases subsecuentes del estudio los análisis se complementaron con las secuencias de los dos espaciadores intergénicos del ADNcp y de la región ITS/5.8S generadas para fríjol lima silvestre por Serrano (2008). Con el fin de evaluar la consistencia de las agrupaciones obtenidas se utilizaron diferentes aproximaciones, tanto en método de reconstrucción, como modelo de evolución de secuencias para los dos conjuntos de datos, obteniendo el mismo tipo de relaciones entre las OTUs (Unidad Taxonómica Operacional) analizadas.

### **2.3. OBJETIVO ESPECÍFICO 3: EFECTO FUNDADOR DE LA DOMESTICACIÓN Y ESTRUCTURA POBLACIONAL**

La diversidad genética entre el fríjol lima domesticado y su ancestro silvestre se estimó con base en dos índices de diversidad usando el programa DNAsp (Rozas *et al.*, 2003) y también se reporta el número de sitios segregantes o polimórficos (S). Los dos índices fueron la diversidad nucleotídica  $P_i$  ( $\pi$ ) (que corresponde al

número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre pares de secuencias) (Nei, 1987, Nei and Miller, 1990) y la diversidad haplotípica ( $H_d$ ) (Nei, 1987). Se calculó el porcentaje de reducción de la diversidad genética del frijol domesticado con respecto al silvestre de ambos acervos (Mesoamericano y Andino) con la siguiente fórmula:

$$\% r = \frac{H_s - H_d}{H_s}$$

donde  $H_s$  es el índice de diversidad para los frijoles silvestres y  $H_d$  es el índice de diversidad para los frijoles domesticados.

La diferenciación genética entre los acervos Mesoamericano (silvestre + domesticado) y andino (silvestre + domesticado) se evaluó a nivel nucleotídico mediante el estadístico  $N_{ST}$  (Lynch and Crease, 1990) y el flujo génico entre los acervos fue calculando como el número de migrantes por generación ( $N_m$ ) a partir del  $N_{ST}$ . También se calculó la estructura genética poblacional a través de un análisis de varianza molecular AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992) para así evaluar la diferenciación genética dentro y entre los acervos usando el programa Arlequín versión 2.0 (Schneider *et al.*, 2000), su nivel de significancia se evaluó realizando 10000 permutaciones.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 ESTUDIO PILOTO: DESARROLLO DE MARCADORES DEL ADNCP E ITS/5.8S POLIMÓRFICOS E INFORMATIVOS PARA ESTUDIOS DE DOMESTICACIÓN EN EL FRÍJOL LIMA SILVESTRE

El secuenciamiento de las 9 regiones del ADNcp inicialmente en seis entradas de germoplasma de fríjol lima silvestre y las seis especies aliadas produjeron 5193 nucleótidos (Tabla 2). La amplificación interespecífica de estas regiones mostró poca variación en tamaño ( $\pm 10$  bp), debida principalmente a pequeños indels. La diversidad nucleotídica  $\Pi$  ( $\pi$ ) de estas nueve regiones se muestra en la Tabla 2. En total se encontró doble cantidad de polimorfismos interespecíficos (101) con relación a los intraespecíficos (50). Con base en los criterios descritos anteriormente, se identificaron tres regiones del ADNcp que mostraron ser útiles para estudios filogenéticos en este género. Estas regiones fueron los espaciadores intergénicos *petA-psbE*, *psbC-trnAser* y *trnS-trnG*, los cuales contienen un % de PI de 1.8%, 1.3% y 1%, respectivamente. Las regiones que resultan más útiles para estudios genético-poblaciones y filogeográficos son aquellas que contienen altos niveles de diversidad genética estructurada geográficamente y que son de fácil amplificación. Dos regiones del cloroplasto mostraron estas propiedades, los espaciadores intergénicos *atpB-rcbL* y *trnL-trnF*, que aunque contienen niveles moderados de diversidad intraespecífica ( $\pi_{intra}$ ) comparados con otras regiones (ver Tabla 2), sus polimorfismos son parsimoniosamente más informativos a nivel intraespecífico (definen linajes intraespecíficos) y además son de fácil y exitosa amplificación en fríjol lima. Estas dos regiones del cloroplasto fueron seleccionadas para el análisis posterior en el total de las muestras de fríjol lima tanto silvestres como domesticadas.

Las regiones *atpB-rcbL* y *trnL-trnF* se amplificaron por PCR y se secuenciaron en el total de 28 entradas de frijol lima silvestre escogidas para el estudio piloto. De estos análisis se detectaron un total de 66 polimorfismos, 32 de cuales fueron intra-específicos y permitieron la identificación de 20 haplotipos de frijol lima silvestre. Estas regiones mostraron una diversidad nucleotídica intraespecífica e interespecífica de 0.00373 y 0.00507, respectivamente. 18 de los 20 haplotipos resultantes están restringidos a regiones geográficas específicas y solamente dos de ellos están ampliamente distribuidos entre Mesoamérica y Sur América. Estos resultados confirman que estas dos regiones del ADNcp son apropiadas para estudios filogeográficos y de domesticación en esta especie.

La región ITS/5.8S también se secuenció en el total de 28 entradas de frijol lima silvestre escogidas para el estudio piloto y se detectaron un total de 84 polimorfismos, 25 de los cuales fueron intraespecíficos y 59 fueron interespecíficos. Esta región mostró una diversidad nucleotídica intraespecífica e interespecífica de 0.00817 y 0.02846, respectivamente (Tabla 2), la cual es muy superior al promedio de diversidad nucleotídica intra e interespecífica del ADNcp. Esta región también resultó ser más informativa bajo el criterio de parsimonia que el ADNcp con un % de PI de 2.2. El secuenciamiento de la región ITS/5.8S en 20 individuos de cada una de dos entradas de germoplasma no detectó ninguna variación intra-entrada, lo cual sugiere que relativamente pocos individuos (o uno solo) pueden ser seleccionados por cada entrada para este tipo de estudios poblacionales.

En resumen, el estudio piloto de polimorfismos mostró que algunas regiones del ADNcp y el ITS/5.8S son útiles para detectar variación inter e intraespecífica para estudios filogenéticos, filogeográficos y de domesticación en esta especie. Para estudios de domesticación en esta especie, un resultado importante es que el uso de estos marcadores permite discriminar entradas de diferentes regiones

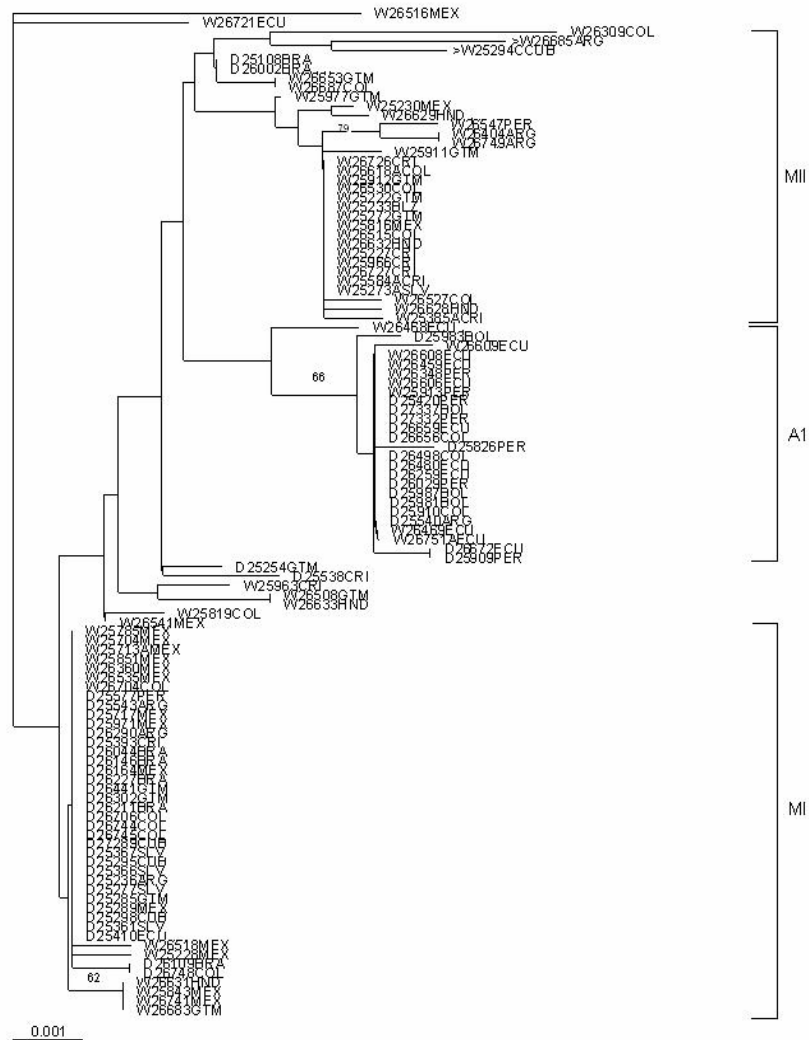
geográficas, aún entre regiones vecinas, lo cual probablemente contribuirá al establecimiento de las posibles áreas de domesticación en esta especie.

### **3.2 EVENTOS DE DOMESTICACIÓN EN *P. LUNATUS* L.**

**3.2.1 DN<sub>Acp</sub>.** Se realizó secuenciamiento de los espaciadores intergénicos *atpB-rbcL* y *trnL-trnF* del ADN<sub>cpl</sub> en una muestra de 50 entradas de frijol lima domesticado (Tabla 1). En total se secuenciaron 1198 pb por cada entrada. Para la región ITS/5.8S se obtuvo secuencia para 659 pb en cada una de las 50 entradas analizadas.

La topología NJ-JC con base en los polimorfismos del ADN<sub>cpl</sub> (Figura 2) muestra que la mayoría de las entradas de frijol lima domesticado se agrupa con dos de los tres acervos de frijol lima silvestre definidos por Serrano (2008), el grupo AI y el grupo MI.

**Figura 2. Topología NJ del ADN<sub>cpl</sub> para *P. lunatus* silvestre (W) y domesticado (D). (pag siguiente)**



Cada entrada indica el país de origen MEX=México, GTM= Guatemala, BLZ= Belice, HND= Honduras, SLV= El Salvador, CRI=Costa Rica, COL= Colombia, CUB= Cuba, ECU= Ecuador, PER= Perú, BOL= Bolivia, ARG= Argentina, BRA= Brasil. Los acervos genéticos A1, MI, MII fueron establecidos según Serrano (2008). Los números sobre las ramas corresponden a los valores de bootstrap (%).

El acervo A1 contiene entradas silvestres cuya distribución está restringida a la vertiente occidental de los Andes de Ecuador y norte del Perú, y entradas

domesticadas presentes en Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Argentina (Tabla 3 y Figura 4). Las entradas domesticadas de este acervo poseen en su mayoría tamaños de semilla grande (peso de 100 semillas mayor a 70g) y han sido identificadas como el cultigrupo “Big Lima” (ver Figura 1). Estos datos sugieren, un primer evento de domesticación en el área de Ecuador-norte del Perú, también sugerido previamente por varios autores (Fofana *et al.*, 1999; Fofana *et al.*, 2001). El acervo MI posee material silvestre de distribución Mesoamericana, en especial en las tierras mexicanas al norte y al noroccidente del Istmo de Tehuantepec, excepto por tres entradas de Guatemala, Honduras y Colombia (Tabla 3), y el material domesticado de semilla pequeña distribuido desde México hasta Argentina (Tabla 3, Figura 4). Este agrupamiento revela un segundo evento de domesticación dentro de *P. lunatus*, posiblemente a partir de poblaciones silvestres de semilla de tamaño pequeño, ubicadas preferiblemente al norte y noroccidente del Istmo de Tehuantepec. En estudios anteriores, por ejemplo el estudio realizado por Gutiérrez-Salgado (1995), no se había podido establecer la posible región de domesticación en el acervo genético mesoamericano debido al poco poder de resolución del tipo de herramienta molecular utilizada. Gutiérrez-Salgado (1995) realizó análisis de patrones electroforéticos de faseolina, la proteína más abundante en la semilla, y encontró que el patrón electroforético de mayor frecuencia en el frijol lima domesticado correspondía también al más abundante en el frijol lima silvestre con una amplia distribución en Mesoamérica y en los Andes, lo que no permitió definir una posible área de origen de los tipos domesticados.

**Figura 3. Topología NJ del ITS/5.8S para *P. lunatus* silvestre (W) y domesticado (D).**



Cada entrada indica el país de origen MEX=México, GTM= Guatemala, BLZ= Belice, HND= Honduras, SLV= El Salvador, CRI=Costa Rica, COL= Colombia, CUB= Cuba, ECU= Ecuador, PER= Perú, BOL= Bolivia, ARG= Argentina, BRA=Brasil. Los acervos genéticos AI, MI, MII fueron establecidos según Serrano

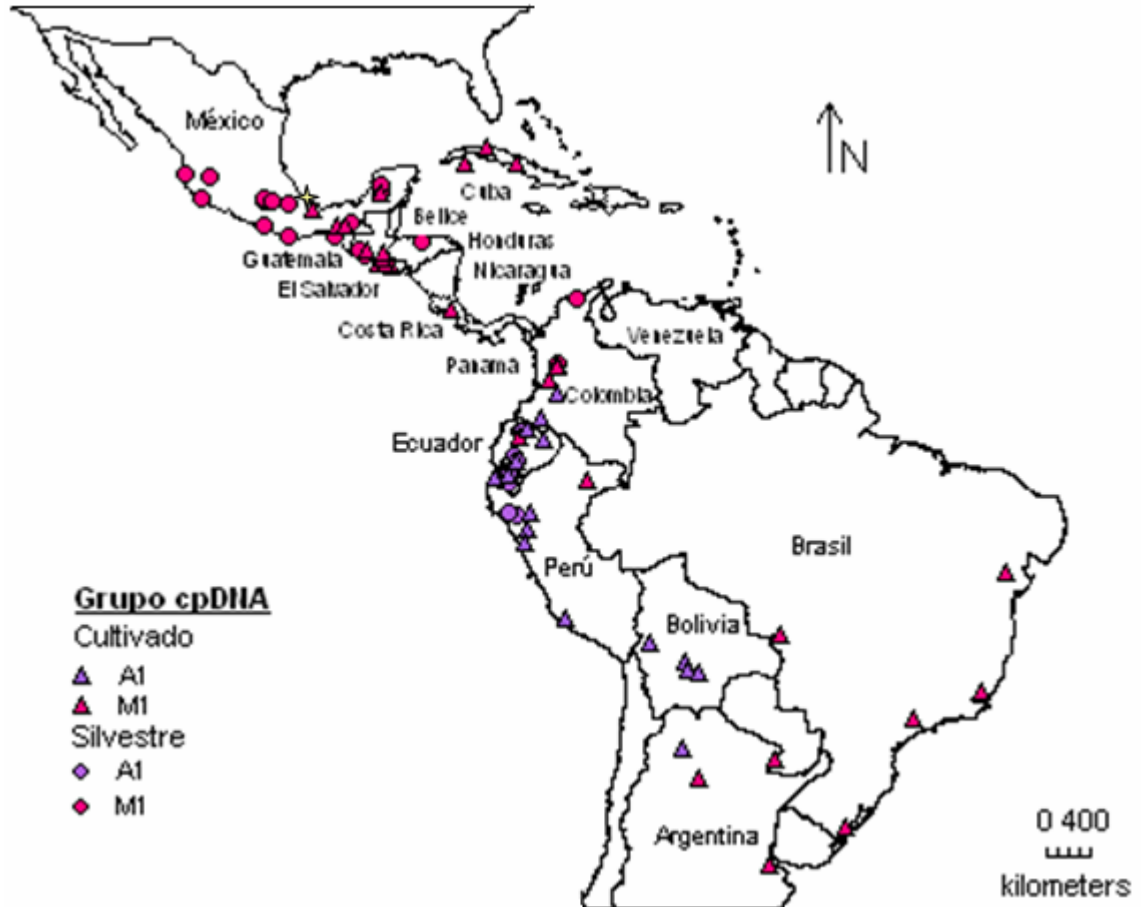
(2008). Los números sobre las ramas corresponden a los valores de bootstrap (%).

**Tabla 3. Distribución geográfica de entradas de germoplasma del frijol lima silvestre y domesticado de los acervos genéticos Andino y Mesoamericano.**

Región		Acervo				Total
		AI		MI		
		W	D	W	D	
	México	-	-	10	4	14
	Guatemala	-	-	1	3	4
	El					
Mesoamérica	Salvador	-	-	-	4	4
	Honduras	-	-	1	-	1
	Costa Rica	-	-	-	1	1
Caribe	Cuba				3	3
	Colombia	-	3	1	4	8
	Bolivia	-	4	-	-	4
Suramérica	Brasil	-	-	-	5	5
	Ecuador	7	4	-	1	12
	Perú	2	5	-	1	8
	Argentina	-	1	-	3	4
<b>Total</b>		9	17	13	29	68

Los acervos genéticos Andino (AI) y Mesoamericano (MI) definidos según la topología NJ para el ADNcp (Figura 2), - = haplotipo no presente en esa región, (W) silvestre, (D) domesticado.

Figura 4. Distribución geográfica de entradas de germoplasma del frijol lima silvestre y cultivado de los acervos genéticos Mesoamericano MI y Andino AI.



Definidos según la topología NJ para el ADNcp (Figura 2). Triángulo= material domesticado, Círculo= material silvestre, morado= grupo A1, rosado= grupo M1. Estrella= Istmo de Tehuantepec.

El acervo MII esta conformado básicamente por entradas de frijol lima silvestre que poseen una distribución mayor, que comprende las islas del Caribe, la península de Yucatán y Mesoamérica especialmente en el área al sur y suroriente del Istmo de Tehuantepec, y en Suramérica, incluyendo Colombia, sur de Perú y norte de Argentina siempre en la vertiente oriental de los Andes. En el acervo MII solo se encuentran dos entradas domesticadas procedentes de Brasil. Puede ser posible un tercer evento de domesticación a partir del acervo mesoamericano silvestre MII, pero debido al número reducido de entradas de Brasil dentro de este acervo (solo dos entradas) es difícil interpretar el significado de este agrupamiento, es decir, si este agrupamiento representa o no un tercer evento de domesticación. Para dilucidar este posible tercer evento de domesticación es necesario incluir un mayor número de entradas silvestres y domesticadas que comprendan la distribución del acervo mesoamericano MII.

**3.2.2 ITS.** Para la región ITS/5.8S se encontró el mismo patrón observado para el ADNcp en donde las entradas de frijol lima domesticado se agrupan con las entradas silvestres en solo dos acervos, el acervo AI y el acervo MI (Figura 3).

Estos dos acervos igualmente dan soporte a los dos eventos de domesticación propuestos anteriormente. Un evento de domesticación en la región de Ecuador-norte del Perú (acervo genético AI) habría dado origen al cultigrupo “Big Lima” de distribución Suramericana (Tabla 4 y Figura 5). Un segundo evento de domesticación, a partir de poblaciones silvestres de semilla de tamaño pequeño, habría tomado lugar en México, especialmente en tierras al norte y noroccidente del Istmo de Tehuantepec (acervo genético MI), y habría dado origen al frijol lima cultivado Mesoamericano, actualmente de amplia distribución desde México hasta Argentina (Tabla 4, Figura 5). No se observa en ninguna de las topologías (de ADNcp o ITS/5.8S) diferenciación de los tipos domesticados Mesoamericanos en dos grupos que pudieran corresponder a los cultigrupos “Sieva” y “Potato”, por lo

tanto, no hay soporte para la clasificación del frijol lima domesticado Mesoamericano en estos dos cultigrupos.

**Tabla 4. Distribución geográfica de entradas de germoplasma del frijol lima silvestre y domesticado de los acervos genéticos Andino y Mesoamericano.**

Región	Acervo				Total
	AI		MI		
	W	D	W	D	

**Figura 5. Distribución geográfica de entradas de germoplasma del frijol lima silvestre y cultivado de los acervos genéticos Mesoamericano MI y Andino AI.**



Definidos según la topología NJ para el ITS/5.8S (Figura 3). Triangulo= material domesticado, Círculo= material silvestre, morado= grupo AI, rosado= grupo MI. Estrella= Istmo de Tehuantepec.

La domesticación de plantas en las Américas presenta un gran número de ejemplos de múltiples domesticaciones independientes en diferentes especies del mismo género y en pocos casos en la misma especie, en diferentes regiones del amplio rango de distribución de su progenitor silvestre y ejercido por diferentes grupos humanos. *P. vulgaris* y *P. lunatus* son los ejemplos mejor conocidos de múltiples domesticaciones conespecíficas. En *P. vulgaris* un evento de domesticación se originó a partir del acervo genético andino posiblemente en la parte central-sur de Perú; y el acervo genético mesoamericano fue posiblemente domesticado más de una vez; un primer evento de domesticación originó la raza Jalisco en la región de Jalisco y otro evento independiente de domesticación originó la raza Mesoamérica en Oaxaca, y la raza Durango pudo ser domesticada mas hacia el norte posiblemente en Durango (Chacón *et al.*, 2005).

De acuerdo al registro arqueológico, el frijol lima fue domesticado después que el maíz y que especies del género *Cucurbita*. En la costa del Perú, en la Cueva Guitarrero en Ancash, Perú y en Chilac, Lima, Perú, se encontró registro de *P. lunatus* domesticado que data de 3500 y 5600 años antes del presente (B.P.) respectivamente, en donde no hay registros de frijoles lima silvestres (Kaplan and Lynch, 1999), por lo que se puede presumir que *P. lunatus* fue domesticado aproximadamente 6000 años antes del presente en el Perú. La datación de radiocarbono AMS de frijol lima de Tehuacán, México, sugiere que la presencia de frijol lima cultivado en Mesoamérica no ha sido antes de 2500 B.P (Kaplan and Lynch, 1999), apoyando un evento de domesticación mas reciente en Mesoamérica que en los Andes. Los registros arqueológicos tanto en Mesoamérica como en los Andes se encuentran cerca o dentro de las dos áreas de domesticación propuestas en el presente estudio.

Muchas de las plantas cultivadas de importancia económica, no solo en las Américas sino también en el mundo, son de origen americano. Por ejemplo, el cacao (*Theobroma cacao*) se originó en Sur América en la pendiente oriental de

los Andes, desde donde se expandió por el valle Amazónico y migró hacia el norte y occidente donde fue domesticado, y después fue introducido por el hombre en Centro América y sur de México (Motamayor *et al.*, 2002). La yuca *M. esculenta ssp esculenta* derivó de un progenitor silvestre Suramericano (*M. esculenta ssp flabellifolia*) en el sur de la Amazonía (Schaal and Olsen, 2000) desde donde fue introducida posteriormente en el continente Africano donde actualmente es un cultivo básico. La papa fue domesticada en tierras al sur de Perú (Spooner *et al.*, 2005) y fue introducida en tiempos precolombinos en otras zonas del norte y sur de los Andes, y en tiempo más modernos fue introducida en Europa y USA. Estos patrones nos revelan cómo los cultivos fueron dispersados de su centro de domesticación original y algunos de ellos intercambiados entre Mesoamérica y Suramérica, e incluso en otros continentes. Igualmente, patrones de dispersión se pueden inferir para el frijol lima desde sus centros de domesticación. Posterior a la domesticación, el frijol lima domesticado habría sido dispersado por el hombre desde su área de domesticación en México hacia Centroamérica y habría entrado en Suramérica, posiblemente en tiempos precolombinos. Igualmente, el frijol lima domesticado andino habría sido dispersado desde el Ecuador-Norte del Perú hacia el norte y sur de los Andes.

### **3.3. EFECTO FUNDADOR DE LA DOMESTICACIÓN Y ESTRUCTURA POBLACIONAL**

Se calculó el porcentaje de reducción de la diversidad genética del frijol domesticado con respecto al frijol silvestre en los dos eventos de domesticación (Mesoamericano MI y Andino AI) (Tabla 5). Para el ADNcp, se observó un mayor porcentaje de reducción de la diversidad genética en el evento de domesticación mesoamericano (100%) comparado con el evento de domesticación andino (86.84%). Para el ITS/5.8S se presentó una reducción de 45.71% y 67.75% para los eventos de domesticación mesoamericano y andino, respectivamente. Cuando

se compara la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) entre frijoles domesticados y silvestres dentro de cada uno de los dos acervos se observa una reducción significativa de la diversidad genética debida al proceso de domesticación. Esta reducción de la diversidad genética ocurre principalmente por la selección de un número reducido de plantas silvestres para su adaptación a los ambientes de cultivo (efecto fundador), y también por el reemplazo de cultivos tradicionales por cultivos de alto rendimiento que son muy uniformes genéticamente. Es de gran importancia mantener y conservar la diversidad genética ya que esta confiere mayores ventajas frente a patógenos y enfermedades.

**Tabla 5. Análisis de diversidad genética ADNcp (atpB – rbcL y trnL – trnF) y la región ITS/5.8S del frijol lima domesticado y silvestre de los acervos Mesoamericano MI y Andino AI.**

Grupo	No. OT U	No. de sitios	S	PI	H	Hd $\pm$ SD	$\pi$ $\pm$ SD	% de reducción
<b>ADNcp</b>								
Domesticado Andino	17	1198	1	0	2	0.118 $\pm$ 0.10	0.00010 $\pm$ 0.00	86.84
Silvestre Andino	9	1192	4	0	3	0.417 $\pm$ 0.19	0.00076 $\pm$ 0.00	
Domesticado Meso	29	1193	0	0	1	0.000 $\pm$ 0.00	0.00000 $\pm$ 0.00	100
Silvestre Meso	13	1192	3	1	4	0.654 $\pm$ 0.10	0.00065 $\pm$ 0.00	
<b>ITS/5.8S</b>								
Domesticado	14	645	3	2	4	0.495 $\pm$ 0,15	0.00119 $\pm$ 0.00	67.75

Andino						1	041	
Silvestre Andino	7	645	7	2	4	0.714±0.18	0.00369±0.00	
						1	116	
Domesticado						0.495±0.10	0.00228±0.00	
Meso	31	659	9	7	7	7	069	45.71
Silvestre Meso	9	657	6	6	5	0.722±0.15	0.00420±0.00	
						9	118	

Los acervos están definidos por las topologías de NJ (Figuras 2 y 3). S: Sitios polimorficos, PI: Sitios informativos bajo el criterio de parsimonia, H: número de haplotipos, Hd: Diversidad Haplotípica,  $\pi$ : Diversidad Nucleotídica, SD: desviación estándar. El % de reducción está calculado con base en  $\pi$ .

La diferenciación genética entre los acervos del ADNcp andino (AI) y mesoamericano (MI) es bastante grande con valores de  $N_{ST} = 0.990$ , los cuales indican altos niveles de subdivisión poblacional ( $N_{ST} > 0.5$ , ver Tabla 6). Este mismo patrón de diferenciación se observa en los grupos evaluados para el ITS/5.8S con un valor de  $N_{ST} = 0.861$ . La estimación del número de migrantes entre los dos acervos ( $N_m$ ) muestra un escenario de flujo génico restringido para el ADNcp e ITS/5.8S ( $N_m < 1.0$  en ambos casos, Tabla 6), corroborando el alto grado de diferenciación entre los dos acervos los cuales están también separados espacialmente. El bajo flujo génico encontrado puede estar influido por el hecho de que la especie posee un sistema de reproducción mixto, siendo predominantemente autógena (alrededor del 90%) y su limitada habilidad para la dispersión de polen y semillas (Zoro *et al.*, 2005; Maquet *et al.*, 1997).

**Tabla 6. Diferenciación genética y flujo génico entre los acervos genéticos de *P. lunatus* silvestre y domesticado.**

		ADNcp	ITS/5.8S
Fuente de variación	Dentro de	0.71	15.50
%	grupos		
	Entre grupos	99.29	84.50
Índices de fijación	$\Phi_{ST}$	0.993**	0.845**
	$N_{ST}$	0.990	0.861
Flujo génico	$N_m$	0.00	0.04

\*\*p<0.001

	México	-	-	8	4	12
	Guatemala	-	-	1	4	5
Mesoamérica	El Salvador	-	-	-	4	4
	Honduras	-	-	-	-	-
	Costa Rica	-	-	-	2	2
Caribe	Cuba				3	3
	Colombia	1	1	-	5	7
	Bolivia	-	2	-	-	2
Suramérica	Brasil	-	-	-	5	5
	Ecuador	4	5	-	-	9
	Perú	2	5	-	1	8
	Argentina	-	1	-	3	4
<b>Total</b>		7	14	9	31	61

Acervos genéticos Andino (AI) y Mesoamericano (MI) definidos según la topología NJ para la región ITS/5.8S (Figura 3), - = haplotipo no presente en esa región, (W) silvestre, (D) domesticado.

Los acervos AI y MI están definidos de acuerdo a las figuras 2 y 3 para polimorfismos del ADNcp e ITS/5.8S respectivamente.  $\Phi_{ST}$ , análogo de  $F_{ST}$  estimado vía AMOVA.  $N_{ST}$ , índice de diferenciación genética con base en secuencias.  $N_m$ , número de migrantes estimado a partir de  $N_{ST}$ .

Los resultados del AMOVA también indican una alta diferenciación entre los acervos AI y MI tanto para el ADNcp como para el ITS/5.8S con un índice de fijación  $\Phi_{ST}$  de 0.993 y 0.84505, respectivamente (Tabla 6). Serrano (2008) estimó un tiempo de divergencia de los acervos genéticos en el fríjol lima silvestre de aproximadamente 1.1 Ma; una vez diferenciados, a partir de cada uno de éstos se derivaron sus formas domesticadas andinas y mesoamericanas, presentándose una alta divergencia entre cada uno de los acervos. El porcentaje de variación al interior de cada uno de los dos acervos es bastante bajo lo cual es de esperarse ya que al interior de cada uno se agrupan los frijoles domesticados con sus parientes silvestres los cuales no han tenido mucho tiempo para divergir dado que los procesos de domesticación han ocurrido muy recientemente (hace aproximadamente 10.000 años).

La alta diferenciación genética entre los acervos andino y mesoamericano nos indica que cada uno de éstos ha probablemente fijado alelos alternos para los loci bajo estudio y también sugiere que éstos pueden albergar alelos diferentes que confieren características de adaptación a los diferentes ambientes de cultivo en los que actualmente se encuentran, indicando que es necesario preservar la diversidad genética presente en los dos acervos.

Es de vital importancia tener conocimiento de los niveles de diversidad genética de las especies silvestres y domesticadas para realizar un eficiente manejo de los recursos genéticos, ya sea para la conservación o utilización en los programas de mejoramiento de plantas. Según Engels et al. (2006), los centros de origen y diversidad de nuestros cultivos son de importancia crítica para los esfuerzos de

mejoramiento de cultivos actuales y del futuro ya que ellos pueden albergar la mayor parte de la diversidad genética de un acervo genético dado; incluyendo especies domesticadas también como sus parientes silvestres y los tipos asilvestrados o “weedy” (en inglés). Los procesos de adaptación y selección en los acervos genéticos de los cultivos se llevan a cabo en esos centros, especialmente en los sistemas de producción agrícola tradicional donde los agricultores continúan jugando un papel importante en el manejo y mantenimiento de esta diversidad genética.

La conservación in situ de la diversidad genética de especies silvestres y los parientes silvestres de las plantas cultivadas en ecosistemas naturales protegidos, junto con programas de conservación ex situ, son una de las posibles estrategias eficientes que aseguran su supervivencia para el futuro. Esto siempre y cuando se realice un adecuado esquema de muestreo a nivel poblacional y geográfico del número de plantas que van a mantener la multiplicidad de alelos de las especies predominantemente autógamias como el frijol lima (Zoro *et al.*, 1998)

#### 4. CONCLUSIONES

La exploración de múltiples marcadores de ADN, tanto de organelas como nucleares, permite la identificación de regiones informativas, según la pregunta de investigación. En este caso, las regiones espaciadoras del genoma cloroplástico *atpB-rbcL* y *trnL-trnF*, así como el ITS/5.8S, representando el genoma nuclear, demostraron ser fuente de información apropiada para estudios filogeográficos y de domesticación en *P. lunatus*. Dichos marcadores moleculares poseen alto número de polimorfismos intra e interespecíficos, que en compañía de su alta reproducibilidad permiten su utilización. La diversidad genética observada en estas regiones de ADN se encuentra estructurada geográficamente, permitiendo la detección de los eventos de domesticación dentro del frijol lima y brindando información para el estudio filogeográfico dentro de la especie.

Varios autores (Gutiérrez *et al.*, 1995, Fofana *et al.*, 2001) sugieren un evento de domesticación para el frijol lima en la región Andina (Ecuador y norte de Perú) el cual habría dado origen al cultigrupo “Big Lima”, y un segundo evento para el acervo mesoamericano, en una región que podía estar en algún lugar de México, Centroamérica, e incluso el Caribe. Con este estudio se revalida el primer evento de domesticación a partir de semillas silvestres de tamaño grande en Ecuador y norte de Perú (acervo AI) el cual originó el cultigrupo “Big Lima” (acervo andino con semilla de tamaño grande). El presente estudio sugiere un área más restringida para el segundo evento de domesticación, a partir de semillas silvestres de tamaño pequeño, específicamente en tierras mexicanas (Sierra Madre del Sur y el Cinturón Volcánico Trans-Mexicano) al norte y noroccidente del Istmo de Tehuantepec (acervo MI). El presente trabajo no apoya la existencia de los dos cultigrupos mesoamericanos “Sieva” y “Potato” propuestos por Baudet (1977) como grupos naturales.

De acuerdo al estudio realizado por Serrano (2008) se reconocen tres acervos genéticos en el frijol lima silvestre, uno Andino AI y dos Mesoamericanos MI y MII, los cuales presumiblemente divergieron o se separaron tempranamente en la historia evolutiva de la especie. Como se mencionó anteriormente un evento de domesticación se originó a partir del acervo genético Andino (AI) y un segundo evento de domesticación a partir del acervo genético Mesoamericano (MI), sin embargo es necesario realizar un estudio más detallado con un mayor número de muestras de frijol lima silvestre y domesticado de distribución mesoamericana para establecer más precisamente el área de domesticación en esta región.

Los resultados muestran un efecto fundador marcado tanto en los Andes como en Mesoamérica, lo cual sugiere que el frijol lima silvestre puede contener variabilidad genética no presente en los frijoles domesticados, y por lo tanto, se hace necesaria la conservación de estos recursos vegetales con el fin de asegurar el buen uso de este germoplasma en futuros programas de mejoramiento en esta especie.

## BIBLIOGRAFÍA

Anderson GJ, Jansen RK, Kim Y (1996) The origin and relationships of the pepino, *Solanum muricatum* (Solanaceae): DNA restriction fragment evidence. *Economic Botany*. 50: 369-380.

Asmussen CB, Liston A (1998) Chloroplast DNA characters, phylogeny and classification of *Lathyrus* (Fabaceae). *American Journal of Botany*. 85: 387-401

Bailey CD, Doyle JJ (1997) A comparison of the potential genetic utility of an intron of the MADS box gene *pistillata* to the nrDNA ITS and the chloroplast *trnL* intron in *Sphaerocardamum Schauer* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*. 84: 175

Bakker FT, Culham A, Daugherty LC, *et al.*, (1999) A *trnL-F* based phylogeny for species of *Pelargonium* (Geraniaceae) with small chromosomes. *Plant Systematics and Evolution*. 216:309-324

Baudet JC (1977) Origine et classification des espèces cultivées du genre *Phaseolus*. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belgique* 110: 65-76.

Becerra Velásquez VL, Gepts P (1994) RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in its centres of origin. *Genome*. 37: 256-263.

Beebe S, Skroch PW, Tohme J, Duque MC, Pedraza F, Nienhuis J (2000) Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop Science*. 40: 264-273.

Buckler IV, Holtsford TP (1996) *Zea* systematics: ribosomal ITS evidence. *Molecular Biology and Evolution*. 13: 612-622.

Birky W Jr. (1995) Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: Mechanisms and evolution. *Proc. Natl. Acadm. Sci. USA*. 92: 11331-11338.

Caicedo AL, Gaitan E, Duque MC, Toro O, Debouck DG, Tohme J (1999) AFLP fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from South America. *Crop. Science*. 39: 1497-1507.

Chacón MI, Pickersgill B, Debouck DG (1999) Intraspecific chloroplast DNA diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris*) for domestication studies. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*. 42: 79-80.

Chacón MI, Pickersgill B, Debouck DG (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 MI (2001) Chloroplast DNA polymorphisms and the evolution and domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). PhD Thesis-The University of Reading, Reading, England.

Chiang TY, Schaal BA, Peng CI (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.

Clegg MT, Brown AHD, Whitfeld PR (1984) Chloroplast DNA diversity in wild and cultivated barley: implications for genetic conservation. *Genetical Research*. 43: 339-343.

Clement M, Posada D, Crandall K (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1660

Corriveau, J.L., Coleman, A.W. (1988) Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. *American Journal of Botany* 75:1443–1458

Debouck DG, Liñan J, Campanas S, De La Cruz A, Rojas JH (1987) Observations on the domestication of *Phaseolus lunatus* L. P1. *Genet. Resources Newslett.* 70:26-32.

Debouck DG (1996) Colombian Common and Lima beans: views on their origin and evolutionary significance. *Revista Corpoica* 1: 7-15

Delgado-Salinas A, Turley T, Richman A, Lavin M (1999) Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). *Systematic Botany.* 24 (3):438-460.

Demesure B, Sodji N, Petit RJ (1995) A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology.* 4: 129-131

Diamond J (2002) Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature.* 418: 700-707.

Dick C, Abdul-Salim K, Bermingham E (2003) Molecular Systematic Analysis Reveals Cryptic Tertiary Diversification of a Widespread Tropical Rain Forest Tree. *The American Naturalist,* 162: 691-703.

Doebley J (1992) Mapping the genes that made maize. *Trends in Genetics*. 8: 302-307.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*. 19: 11-15.

Dutech C, Maggia L, Joly L (2000) Chloroplast diversity in *Vouacapoua americana* (Caesalpinaceae), a neotropical forest tree. *Molecular Ecology*. 9: 1427-1432

Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, Vol. 32, No. 5 1792-1797.

Fofana B, Baudoin JP, Vekemans X, Debouck DG, Du Jardin P (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, du Jardin P, Baudoin JP (2001) Genetic diversity in the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by chloroplast DNA (cpDNA) variations. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 48(5): 437-445.

Engels JMM, Ebert AW, Thormann I and de Vicente MC (2006) Centres of crop diversity and/or origin, genetically modified crops and implications for plant genetic resources conservation. *Genetics Resources and Crop Evolution*. 53: 1675-1688.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131: 479-491.

Gepts P (1988) Genetic Resources of Phaseolus beans Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 613.

Gepts P (1997) What can molecular markers tell us about the process of domestication in common bean. In: A. B. Damania, J. Valkoun, G. Willcox and C. O. Qualset (eds.) The Harlan Symposium. ICARDA, IPGRI, FAO and UC/GRCP, Aleppo, Syria. pp. 198-209

Gepts P (2002) A Comparison between Crop Domestication, Classical Plant Breeding, and Genetic Engineering. Crop Science. 42: 1780-1790.

Gutiérrez Salgado A, Gepts P, Debouck DG (1995) Evidence for two gene pools of the Lima bean, *Phaseolus lunatus* L. , in the Americas. Genetic Resources and Crop Evolution. 42: 15-28.

Hall T (2001) Bioedit Version 5.0.6. Biological sequence alignment editor. Copyright 1997-2001.

Hamilton MB (1999) Four primers pair for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. Molecular Ecology. 8: (3), 521-523

Hare MP (2001) Prospects for nuclear gene phylogeography. Trends in ecology and evolution. 16(12): 700-706.

Harlan JR (1975) Geographic patterns of variation in some cultivated plants. Journal of Heredity. 66: 184-191.

Harlan JR (1976) Plant and Animal Distribution in Relation to Domestication. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. 275 (936): 13-25.

Harlan JR (1992) *Crops & Man*, Second ed. American Society of Agronomy, Inc. Crop Science Society of America, Inc., Madison, pp. 284.

Harlan JR (1995) *The living fields our agricultural heritage*. Cambridge University Press, pp 30.

Heun MR, 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.

Hilton H, Gaut BS (1998) Speciation and domestication in maize and its wild relatives: evidence from the Globulin-1 gene. *Genetics*. 150: 863-872.

Hosaka K, Hanneman JR (1988) Origin of chloroplast DNA diversity in the Andean potatoes. *Theoretical and Applied Genetics*. 76: 333-340.

Khairallah MM, Sears BB, Adams MW (1992) Mitochondrial restriction fragment length polymorphisms in wild *Phaseolus vulgaris* L.: insights on the domestication of the common bean. *Theoretical and Applied Genetics*. 84: 915-922.

Kaplan L, Lynch TF (1999) *Phaseolus* (Fabaceae) in archaeology: AMS radiocarbon dates and their significance for pre-Colombian archaeology. *Economic Botany*. 53: 261-267.

Kupzow AJ (1980) Theoretical basis of the plant domestication. *Theoretical and Applied Genetics*. 57: 65-74.

Ladizinsky G (1998) *Plant evolution under domestication*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp. 254.

Lynch M, Crease T (1990) The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Molecular Biology Evolution*. 7 (4): 377-394

Maquet A, Zoro B, Delvaux B, Wathelet B, Baudoin JP (1997) Genetic structure of a lima bean base collection using allozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 95: 980-991.

Maquet A, Vekemans X, Baudoin JP (1999) Phylogenetic study on wild allies of Lima bean, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae), and implications on its origin. *Plant Systematics and Evolution*. 218:43-54

Motamayor JC, Risterucci AM, Lopez PA, Ortiz CF, Moreno CF, Lanaud C. (2002) Cacao domestication I: The origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*. 89: 380-386.

Nei M & Miller JC (1990) A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. *Genetics* 125: 873–879.

Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.

Pickersgill B (2007) Domestication of Plants in the Americas: Insights from Mendelian and Molecular Genetics. *Annals of Botany* 100: 925-940.

Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.

Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM, Rausher JT, Smith WA (1998) Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* 7: 465-474.

Schaal BA, Olsen KM (2000) Gene genealogies and population variation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(13): 7024-7029.

Schaal B, Gaskin J, Caicedo A (2003) Phylogeography, Haplotype Trees, and Invasive Plant Species. *Journal of Heredity* 94: 197-204.

Schneider, S., Roessli, D., and Excoffier, L. (2000) Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.

Serrano Serrano, M.L. (2008) Filogeografía del frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) silvestre y su relación con especies afines mesoamericanas y andinas. Tesis de grado, BSc. Escuela de Biología, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.

Singh SP, Gepts P, Debouck DG (1991) Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany* 45: 379-396

Small RL, Ryburn JA, Cronn RC, Seelanan T, Wendel JF (1998) The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear Adh sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. *American Journal of Botanical*. 85: 1301-1315.

Soltis D, Soltis P, Ranker T, Ness B (1989) Chloroplast DNA variation in a wild plant, *Tolmie menziessi*. *Genetics*. 121: 819-826.

Spooner MD, Malean K, Ramsay G, Waugh R, Bryan GJ (2005) A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism. *Proceeding of the Nacional Academy of Science. USA* 102: 14694-14699.

Swofford DL (1998) *Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 4.0*. Sinauer Associates, Sunderland (USA).

Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*. 17: 1105-1109.

Palmer JD, Schields CR, Cohen DB, Orton TJ (1983) Chloroplast DNA evolution and the origin of amphidiploid Brassica species. *Theoretical and Applied Genetics*. 65: 181-189.

White T, Bruns J, Lee T, Taylor W (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Shinsky, and T. J. White, eds. Academic Press Inc., London.

Xu DH, Abe J, Sakai M, Kahazawa A, Shimamoto Y (2000) Sequence variation of non-coding regions of chloroplast DNA of soybean and related wild species and its implications for the evolution of different chloroplast haplotypes. *Theoretical and Applied Genetics*. 101: 724-732

Zohary D (2004) Unconscious selection and the evolution of domesticated plants. *Economic Botany*. 58: 5-10.

Zoro B, Marquet A, Degreef J, Wathelet B, Baudoin JP (1998) Sample Size for collecting seeds in germplasm conservation: the case of the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Theor Appl Genet.* 97: 187-194

Zoro B, Maquet A, Baudoin JP (2005) Mating system of wild *Phaseolus lunatus* L. and its relationship to population size. *Heredity* 94: 153-158.