



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

112

ESTUDIO DE LA RESPUESTA AL FOTOPERÍODO EN FRIJOL COMÚN
(*Phaseolus vulgaris* L.) MEDIANTE ISSRs Y RAPDs

OLIVIA ANDREA MEDERO SÁNCHEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O



MÉXICO, DISTRITO FEDERAL
AGOSTO DEL 2007

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACION DISCONTINUA

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

Por la confianza, amor, cariño y apoyo incondicional que siempre me han brindado en cada paso, decisión y actividades de mi vida. Especialmente en la realización de ésta.

A MIS HERMANAS:

Por su apoyo, amor y paciencia que me tuvieron en la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la ENEP IZTACALA: Por proporcionarme los medios para tener las bases necesarias de una formación profesional.

Al CONACYT: Por el apoyo financiero para la realización de este proyecto.

Al INIFAP CEVAMEX: (LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA) Por las facilidades prestadas para la realización de esta tesis.

AL DR. HÉCTOR GUILLÉN ANDRADE: Por darme la oportunidad de conocer y aprender la investigación, por su dirección, apoyo, orientación y consejos en la realización de esta tesis así como su confianza que tuvo hacia mi para lograr una etapa mas de mi formación profesional.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS: Víctor, Emiliano, Lourdes, Raquel, Yolanda, Verónica, Ernesto, Gerardo, Ricardo y Felipe. Por las sugerencias, consejos y sobre todo por darme su apoyo, amistad y motivación en la realización de este trabajo.

CONTENIDO

	PAGINA
INDICE DE CUADROS	vi
INDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Generalidades del cultivo de frijol	5
2.2. Adaptación del cultivo de frijol	6
2.3. El fotoperíodo en el cultivo de frijol	10
2.4. Genética de la respuesta al fotoperíodo	12
2.5. Estrategias de análisis de la respuesta al fotoperíodo	13
2.5.1. Estudios convencionales	13
2.6. Tecnología de marcadores moleculares	16
2.6.1. Polimorfismo en el ADN Amplificado por Secuencias Aleatorias (RAPDs)	16
2.6.2. Inter Secuencias Simples Repetidas (I-SSRs)	17
III. MATERIALES Y METODOS	19
3.1. Material Genético	19
3.2. Análisis fenotípico	19
3.3. Análisis genotípico	21

3.3.1. Técnicas de análisis molecular	23
3.3.1.1. Marcadores RAPDs	23
3.3.1.1.1. Condiciones de amplificación	24
3.3.1.1.2. Separación y detección de amplicones	24
3.3.1.2. Marcadores I-SSRs	25
3.3.1.2.1. Condiciones de amplificación	25
3.3.1.3. Análisis de la información	27
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1. Respuesta al fotoperíodo	28
4.2. Nivel de polimorfismo	30
4.3. Identificación de marcadores ligados a la respuesta al fotoperíodo	32
V. CONCLUSIONES	37
VI. BIBLIOGRAFÍA	38
VII. APÉNDICE	52

INDICE DE CUADROS

CUADROS DEL TEXTO

	PAGINA
Cuadro 1. Descripción de algunas características de las líneas progenitoras Pinto Villa, Carioca y Pinto Nacional	20
Cuadro 2. Nivel de polimorfismo detectado con marcadores ISSRs y RAPDs entre las líneas progenitoras Pinto Villa y Carioca; sensible y neutral al fotoperíodo, respectivamente	31
Cuadro 3. Valores de F, probabilidad y varianza fenotípica explicada (%) obtenidos para ocho marcadores moleculares en la población de 45 LERs F ₁₀ de la cruce de Pinto Villa x Carioca	34

CUADROS DEL APENDICE

Cuadro 1A. Días a floración con tratamiento de 10 y 16 horas	52
Cuadro 2A. Características de los Iniciadores RAPDs	53
Cuadro 3A. Características de los Iniciadores ISSRs	53
Cuadro 4A. Significado de cada letra que forma parte de un iniciador	54

INDICE DE FIGURAS

	PAGINA
Figura 1. Programa de amplificación para marcadores RAPDs	26
Figura 2. Programa de amplificación para marcadores ISSRs	26
Figura 3. Frecuencia y distribución para días a floración de 45 líneas endogámicas recombinantes (LERs) F ₁₀ de la población derivada de la cruz de Pinto Villa (PV) x Carioca (C); sensible y neutral al fotoperíodo, respectivamente	29
Figura 4. Polimorfismo detectado en las líneas progenitoras (Pinto Villa (P), Carioca (C) y líneas endogámicas recombinantes. Los iniciadores candidatos para marcadores de la sensibilidad (A) y para la neutralidad (B) al fotoperíodo son: (TTC) ₅ RY-1 y IIVII(TCC) ₅ , respectivamente. Las flechas indican la banda asociada al carácter. El marcador (M) utilizado es $\phi X174/HaeIII$	35
Figura 5. Polimorfismo detectado en las isolíneas de frijol para respuesta diferencial al fotoperíodo: Pinto Nacional-1 (1) y Pinto Nacional 1-1 (2); neutral y sensible al fotoperíodo, respectivamente. La flecha indica la banda asociada a la sensibilidad o a la neutralidad y detectados con los iniciadores: (TTC) ₅ RY-1 (A) y IIVII(TCC) ₅ (B)	36

RESUMEN

El fotoperíodo en frijol es un carácter importante en la producción del cultivo de frijol; variedades neutrales muestran una mayor productividad en diferentes ambientes, mientras que las sensibles se comportan mejor en ambientes de valles altos como es el caso del Altiplano de México. Con el objeto de analizar el control genético de la respuesta al fotoperíodo, se evaluó una población de 45 líneas endogámicas recombinantes (LERs) F10 generadas de la cruce de Pinto Villa x Carioca; sensible y neutral en su respuesta al carácter. El experimento se condujo bajo condiciones de invernadero con la aplicación de 12 y 16 horas de fotoperíodo, en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. De manera paralela se aisló el ADN de cada una de las LERs y líneas progenitoras para su análisis molecular mediante dos técnicas de marcadores moleculares: las ISSRs y los RAPDs. De manera adicional se utilizaron dos líneas isogénicas para respuesta al fotoperíodo de la variedad Pinto Nacional. Con la información de los días a floración se determinó que la respuesta al fotoperíodo en la población de LER fue de 33 líneas neutrales por 12 sensibles, lo anterior permitió determinar que el carácter bajo estudio estuvo controlado por la acción de un gen. Al hacer la determinación del nivel de polimorfismo detectado por cada tipo de marcador; Los ISSRs determinaron el mayor nivel (85%) con relación al detectado por RAPDs (77%). Estos resultados tienen mayor significancia porque solamente se utilizaron un total de 41 iniciadores ISSRs contra 273 RAPDs. Con el polimorfismo obtenido se hicieron análisis de regresión lineal simple para cada uno de los 604 loci-marcador detectados en la población de LERS. Con lo anterior se logró identificar la presencia de dos marcadores ligados a la respuesta al fotoperíodo: uno de ellos, el

(TTC)₅RY-1 ligado a la sensibilidad y el IIVII (TCC)₅-1 ligado a la respuesta neutral al fotoperíodo. En el primer caso se explica un 19.3 % de la varianza fenotípica total mientras que en el segundo un 14.8%.

I. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo importante en los países tropicales del mundo, se encuentra en América, oriente de África y de Asia, y en el occidente, sur y oriente de Europa (Adams *et al.*, 1985). Es la especie cultivada que ocupa la mayor superficie en los trópicos americanos (Laing *et al.*, 1984) siendo su rendimiento de 17.6 millones de toneladas que representó al 95% de la producción mundial. Sin embargo, el 91 % de esta producción está localizada en los países en desarrollo, mientras que sólo un 9% se produce en los países desarrollados (Estadística Básica del Sector Agropecuario Dirección de Estudios Económicos, 1999). En México, en el mismo año se produjo un total de dos millones de toneladas.

Este cultivo es hasta ahora la principal fuente de proteína para el sector rural y urbano de bajos ingresos, el consumo promedio anual de frijol en el país ascendió 1.4 millones de toneladas (Ledezma *et al.*, 1993; INEGI, 2000) debido a que ha formado un importante binomio dietético con el maíz desde la época precolombina (Kaplan, 1960).

Los estados más importantes por su producción y rendimiento de frijol son: Zacatecas, Sinaloa, Durango, Chihuahua, Nayarit, San Luis Potosí, Chiapas, Guanajuato, Jalisco, Puebla. A nivel mundial en el ciclo primavera-verano se siembra la mayor superficie (25,689,000 has) y se obtiene también la mayor producción (0.7 ton/ha). A nivel Nacional se siembran 2,145,000 de hectáreas con un rendimiento promedio de 0.6 ton/ha. La producción obtenida de en el país durante Marzo- Abril del 2000 fue de 226,833,000 toneladas (INEGI, 2000). En el altiplano de México, el frijol común por lo general se cultiva en condiciones de temporal. En esta amplia región, el cultivo se afecta por diversos factores climáticos, edáficos y biológicos que varían de localidad a localidad y año con año.

Las variaciones en la duración y en la intensidad de los factores climáticos como precipitación, temperatura, humedad, viento y luminosidad, se combinan con factores edáficos como topografía, tipo y profundidad de suelo para formar un ambiente complejo, en el cual se cultiva el frijol. Esto en parte ocasiona bajos rendimientos, ya que esta especie no es particularmente resistente a niveles limitantes de los factores mencionados; sin embargo, gracias a la precocidad y a la plasticidad fenológica exhibida por muchas variedades criollas, su cultivo es una buena opción para los productores (Acosta y White, 1995). Normalmente las plantas requieren para su crecimiento de temperaturas óptima diurnas y nocturnas bajo las cuales los procesos fisiológicos básicos se expresan normalmente. Estas condiciones han provocado la necesidad de realizar diversos estudios relacionados con la evolución de distintos genotipos en ambientes contrastantes.

Desde los experimentos de Garner y Allard en 1920, se sabe que las plantas se comportan diferencialmente con respecto a la cantidad de horas luz. Algunas especies sólo florecen cuando reciben muchas horas luz; otras por el contrario cuando los días son cortos, además de que el fotoperíodo no sólo prepara a la planta para el florecimiento sino que inicia este proceso. La reacción de las plantas al fotoperíodo o termoperíodo tiene muchas implicaciones en la tecnología agrícola y agrobiológica. Aunque el fotoperíodo es un factor climático fijo para una localidad dada, hasta cierto punto es posible alterarlo en el campo variando la fecha de siembra o bien por otros medios. Además, los factores topográficos pueden cambiar el clima; por ejemplo un valle rodeado de montañas altas tendrá un régimen de más horas de frío que otra orientada al sur. Por lo tanto la consideración del fotoperíodo es de gran importancia. (Bonner, 1961). En muchos tipos de respuesta fotoperiódica (sensibilidad o neutralidad) hay plantas con respuesta absoluta o cualitativa y otras con respuesta cuantitativa. Para las plantas con respuesta cualitativa de día corto o

largo esta condición es obligada para florecer y se caracterizan por un cambio brusco en su comportamiento durante un cambio gradual de fotoperíodo crítico bien definido. Las plantas con respuesta cuantitativa o facultativa pueden producir yemas florales bajo cualquier régimen de fotoperíodo, pero puede ser precoz tanto en días cortos como en días largos. Cada planta con respuesta cuantitativa puede tener un fotoperíodo crítico estrecho o umbral (Bernier, 1985). La insensibilidad al fotoperíodo es un carácter deseable en programas de mejoramiento genético ya que se tendrían plantas con buena adaptación a diferentes regiones.

JUSTIFICACIÓN

La importancia de los marcadores moleculares se basa en los principales usos que son de manera general: hacer mapas genómicos, análisis de germoplasma como nuevas fuentes de variación, identificación de genotipos, detección de híbridos y determinación de rangos de autocruza, etiquetado de genes que controla caracteres de importancia comercial, elaboración de mapas de locus con rangos cuantitativos, y estudios de introgresión de genes. Las ventajas con respecto a los caracteres morfológicos, proteínas y flavenoides son que no están influenciados por el medio ambiente, puede usar cualquier parte de la planta y se puede obtener y registrar un ilimitado número de datos.

Por lo anterior y con base en los antecedentes descritos se planteó el presente trabajo de investigación en el cual se plantean los siguientes:

OBJETIVOS:

Objetivo General

Identificar marcadores moleculares para los factores genéticos que condicionan la respuesta del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) al fotoperíodo.

Objetivos Específicos

1.- Caracterizar genótipicamente las isolíneas PN1, PN1-1, Pinto Villa, Carioca y 45 Líneas Endógamicas Recombinantes (LERs) F₁₀ de *Phaseolus vulgaris* L., con dos técnicas de marcadores moleculares.

2.- Correlacionar la respuesta del frijol al fotoperíodo con la variación en el ADN de los materiales bajo estudio.

3.- Identificar marcadores de ADN de frijol común asociados a la respuesta al fotoperíodo.

HIPOTESIS:

La respuesta al fotoperíodo está condicionada por la acción de uno o mas genes y, por lo tanto, es posible identificar marcadores moleculares ligados a la respuesta al fotoperíodo.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. Generalidades del cultivo de frijol

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas de grano más importante para el consumo humano, en México el consumo *per capita* fue de 12.8 Kg en 1997 (INEGI, 2000). A nivel mundial se cultivan alrededor de 225 millones hectáreas, con rendimientos promedio de 578 Kg/ha. América Latina es la zona de mayor producción y consumo donde se estima que se obtiene el 30% de la producción mundial (Voyset, 1983; Gaytán, 1990 y Solórzano, 1994) de esta leguminosa.

En los Valles Altos de México, generalmente a más de 1800 metros sobre el nivel del mar (msnm), se siembra una superficie anual de 1.2 millones de hectáreas, lo que coloca a esta región como la mayor productora en el mundo. Por lo general se cultiva en condiciones de temporal donde el cultivo es vulnerable a los cambios climáticos, edáficos y biológicos; sin embargo, por la precocidad y plasticidad fenológica de muchas variedades criollas se pueden tener buenas opciones de producción (Solórzano, 1994; Acosta y White, 1995).

Voyset (1983) clasifica las variedades de frijol de acuerdo a diferentes criterios: por la forma de consumo pueden ser de grano seco y vaina verde; desde el punto de vista agronómico se consideran variedades precoces o tardías; de acuerdo a la reacción al fotoperíodo se tienen variedades sensibles e insensibles o neutrales; por la reacción a factores limitantes de la producción se clasifican en resistentes y susceptibles.

Una de las características más importantes para clasificar las variedades de frijol desde el punto de vista agronómico es el hábito de crecimiento (Cárdenas, 1984 y Miranda, 1990). Este concepto morfoagronómico, el hábito de crecimiento, podría ser definido como la presentación de la planta en el espacio, como consecuencia de su crecimiento, el cual es

el resultado de la interacción entre los caracteres genéticos y factores externos que varían con el tiempo, a consecuencia del ambiente.

En el frijol, el hábito de crecimiento puede ser determinado o indeterminado; en la actualidad se tiende más a cultivar los del primer tipo, y que también son conocidos como de mata (Solórzano, 1994).

Genetistas como Emerson (1916) y Miranda (1975), afirman que este carácter depende de un par de genes alelomórficos donde el crecimiento indeterminado corresponde al gen dominante y el determinado al homocigoto recesivo (Fanjul, 1978). Sin embargo, algunas variedades pueden presentar hábito determinado en una localidad, y al mismo tiempo indeterminado y trepador en otra. Estas variaciones respecto al hábito de crecimiento parecen estar ligadas a regímenes de luz roja y ultrarroja, donde posiblemente el fitocromo juega un papel importante. En general se considera la siguiente clasificación: hábito de crecimiento determinado arbustivo (Tipo I), hábito de crecimiento indeterminado arbustivo (Tipo II), indeterminado postrado (Tipo III) y con capacidad para trepar (Tipo IV) (Solórzano, 1994).

2.2. Adaptación del cultivo del frijol

La adaptación de los diversos cultivos es un proceso multidimensional y en él juega un papel importante la acción selectiva del medio ambiente sobre el genotipo de la planta, la influencia positiva o negativa de la calidad, intensidad y duración de la luz; temperaturas diurnas y nocturnas, humedad, plagas, enfermedades y tipo de suelo (Solórzano, 1994). La planta de frijol crece bien en regiones con temperaturas promedio de 15 a 27 °C, pero es importante reconocer que existe una gran amplitud de tolerancia entre variedades. En

términos generales las bajas temperaturas retardan el crecimiento, mientras que las altas causan su aceleración (Cárdenas, 1984).

En México el frijol, se cultiva principalmente en condiciones de temporal y de humedad residual, por lo que al igual que otros cultivos, este se ve afectado durante su crecimiento y desarrollo por factores ambientales adversos tales como bajas temperaturas, precipitación pluvial escasa y mal distribuida (Goytia, 1996).

La temperatura es uno de los factores ambientales que afecta la actividad metabólica de las plantas, su influencia es universal y con frecuencia limita el crecimiento y la distribución geográfica de plantas. El régimen de temperatura también determina que ciertos cultivos puedan adaptarse a una región determinada cuando se cumplen los requerimientos climáticos (Esquivel, 1999).

En el frijol y otras leguminosas de grano, los principales factores que afectan la fenología son: la temperatura, el fotoperíodo y el genotipo de la variedad (Ruiz, 1984; Wallace, 1985). Sin embargo, los factores ambientales interactúan ocasionando respuestas diferentes y complejas, en ocasiones el nivel de disponibilidad de nutrientes y de humedad también afecta la fenología, principalmente durante el llenado de grano (Acosta *et al.*, 1990).

El frijol crece bien en diversas zonas agroecológicas con suelos que van de textura limosa hasta ligeramente arenosa, tolera bien los substratos franco-arcillosos sin problemas de sales con pH entre 5.5 y 6.5; además requiere de suelos con buen drenaje.

Los diferentes ambientes en que se cultiva el frijol y las preferencias por determinada clase, hacen que los problemas también sean diversos; para facilitar y dar una mejor atención a éstos, se distingue la producción de frijol en las siguientes zonas:

1). Zona cálida árida. Es la menos importante por la superficie que se siembra, que es de alrededor de 25 mil hectáreas; sus principales problemas son: altas temperaturas, suelos con problemas de sales que provocan clorosis, ataque de roya (*Uromyces appendiculatus*), pudriciones de raíz causada por hongos (*Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*) y en menor medida, virosis; ataque de plagas como mosquita blanca y chicharrita; y mal manejo del agua de riego.

2). Zona templada semiárida. Es la zona donde se siembra la mayor superficie de frijol en el país, alrededor de 700 mil hectáreas. Aporta alrededor del 30% de la producción nacional; por tal razón, cuando ocurren siniestros como sequías o heladas, el grano que se deja de cosechar reduce considerablemente la producción del país. En las siembras de temporal el problema principal es la falta de agua ya que la precipitación pluvial es de 300 a 440 mm. Además del problema de heladas, en menor grado se tienen problemas con enfermedades, entre las que sobresalen la antracnosis (*Colletotrichum lindemutianum*), roya (*Uromyces appendiculatus*) y pudrición de la raíz (*Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*). De las plagas, las más importantes son la conchuela (*Epilachna varivestis*). En la siembra de riego los problemas principales son el manejo deficiente del agua, uso de bajas densidades de población y aplicación ineficiente de fertilizantes e insecticidas, así como de semilla mejorada. Por lo anterior los rendimientos que se obtienen son muy bajos (240 kg/ha).

3). Zona cálida húmeda. Se siembran alrededor de 125 mil hectáreas y los estados que sobresalen son Veracruz y Chiapas; un poco menos de la mitad de esta superficie se siembra durante el ciclo otoño-invierno y la otra parte en primavera-verano. Los principales problemas que se presentan en esta región son: uso de baja densidad de población, falta de agua en la floración y madurez durante el ciclo de verano y al final del ciclo en siembras de

invierno. Las enfermedades de importancia económica son virosis y roya (*Uromyces appendiculatus*).

4). Zona cálida con invierno seco. Se siembran alrededor de 180 mil hectáreas, la mayoría en el ciclo otoño-invierno. Esta superficie constituye el 12% del total nacional; sin embargo, esta región aporta alrededor del 25% de la producción total y constituye un complemento importante a la cosecha que se obtiene en invierno. En las siembras de humedad residual se tienen problemas de falta de agua y manchado de semilla; en siembras de riego hay un deficiente uso del agua. Las enfermedades más importantes son: roya (*Uromyces appendiculatus*), mosaico común y moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum*); las plagas importantes son la mosca blanca y la chicharrita.

La mayoría de las variedades cultivadas son de hábito de crecimiento indeterminado postrado (Tipo III). Algunos de los problemas que se tienen con este tipo de plantas en sistemas de monocultivo son la alta incidencia de plagas y enfermedades que causan graves pérdidas.

En una evaluación hecha con 169 genotipos de origen diferente, en dos regiones de los Altos de la Sierra Mexicana, en un hábitat tipo IV, se observó que todos los materiales modificaron su floración, de la misma manera se comportaron los genotipos procedentes de Durango que son de respuesta intermedia, además de los materiales de Mesoamérica y Nueva Granada (neutrales). En este estudio se concluyó que existe un gradiente a la respuesta al fotoperíodo desde las sierras hacia el sur y norte, el cual está asociado con la madurez (CIAT, 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.3. El fotoperíodo en el cultivo del frijol

En términos generales el fotoperíodo es el número de horas-luz diarias que condicionan la duración del día y de la noche. Las plantas responden de manera diferencial al fotoperíodo dependiendo de su origen geográfico. En general las especies tropicales son de días cortos, mientras que las de zonas templadas requieren días largos, de ahí que muchas plantas de zonas templadas no florezcan cuando se les cultiva en los trópicos (Braun, 1979; Richter, 1982).

El pigmento responsable de la respuesta al fotoperíodo en la inducción de la floración es el fitocromo que está constituido por una cromoproteína que actúa como fotoreceptor. Algunos estudios indican la existencia de dos tipos: Fitocromo I y Fitocromo II. El Tipo I o de tejido etiolado, es abundante en plántulas etioladas y escaso en las verdes; el Tipo II, se presenta en semillas y hojas maduras jóvenes, es más estable que el Tipo I (Salisbury y Ross, 1994).

Como respuesta a la actividad del fitocromo en el frijol se desencadenan varios procesos fisiológicos como la inducción a la floración, diferenciación de flor y fruto, así como la elongación del tallo. El estímulo fotoperiódico captado por este pigmento es más eficiente en las hojas jóvenes (Masaya y White, 1986; Salisbury y Ross, 1994). El fotoperíodo no sólo afecta la floración sino también la formación de nudos y ramas (Laing *et al.*, 1984; Wallace, 1985).

Para que una planta sensible al fotoperíodo pueda florecer se requiere que se encuentre en madurez y que reciba fotoperíodos inductivos durante un número determinado de ciclos (Martínez, 1989). Al respecto se han determinado (Gaytán, 1990) algunas condiciones para inducir la floración en algunos genotipos, tal es el caso de las variedades sensibles N-150 y FM III. El número de ciclos inductivos para obtener el 100% de floración en plantas de

cuatro nudos fue de ocho para N-150 y de 12 para FM III. También se observó que el número de los ciclos necesarios para lograr el 100% de floración es menor a medida que aumenta la edad de la planta y que los períodos críticos para la inducción floral fueron de 13 y de 16.45 horas para N-150 y FM III, respectivamente.

La respuesta al fotoperíodo es un factor importante en la adaptación. La mayoría de las variedades que prosperan en latitudes altas son de respuesta neutral (Allard y Zaumeyer, 1944 citado por Solórzano, 1994). En el caso de las variedades de frijol del Altiplano Mexicano, la mayoría son sensibles (White y Laing, 1989; Acosta y White, 1995), mientras que muchas de origen tropical son neutrales. Esa respuesta contrastante al fotoperíodo en germoplasma de diferente origen, indica un papel importante de los genes que controlan la adaptación del frijol a las diferentes latitudes. Además la respuesta al fotoperíodo es modificada por la temperatura, dependiendo del genotipo (Wallace, 1985).

Aunque hay gran variación en los niveles de sensibilidad a la longitud del día entre variedades, en general, la planta de frijol es sensible. En la mayoría de las variedades los días cortos tienden a acelerar el desarrollo reproductor, por lo que se acepta que el frijol es una planta de día corto, pero el grado de aceleración está en función de las temperaturas presentes, ya que si ocurren temperaturas bajas por períodos de tiempo considerables, el ciclo de la planta se alarga.

Las temperaturas altas tienden a aumentar la sensibilidad de la planta al fotoperíodo, esto es de gran importancia para la investigación en las regiones ecuatoriales, ya que los materiales de zonas frías (14°C) no florecen en las zonas cálidas (25°C) con 12-13 horas luz, pero pueden ser inducidos a florecer con días más cortos (CIAT, 1988).

Normalmente, las investigaciones sobre fotoperíodo hacen énfasis en los efectos sobre la floración, pero en caso de frijol, el fotoperíodo junto con la temperatura afectan muchas

otras características como el grado de ramificación, la longitud del tallo y la duración de la etapa de llenado de las vainas. El efecto de estos factores causa inestabilidad en el hábito de crecimiento y en la longitud del ciclo de las variedades, haciéndolas más precoces o más tardías (CIAT, 1988).

El efecto en los días a floración causado por la interacción fotoperíodo-temperatura-genotipo resulta en un control precedido a la biomasa acumulada en el rendimiento, el cual comienza justo o poco antes de la floración; así la duración del período de llenado de semilla es de los días de la floración a la madurez.

2.4. Genética de la respuesta al fotoperíodo

El control genético de la respuesta al fotoperíodo en frijol se ha estudiado por una gran cantidad de investigadores; algunos (Coyne, 1978b; Masaya *et al.*, 1986; Wallace *et al.*, 1993; Mmopi *et al.*, 1995), mencionan que la respuesta al fotoperíodo puede estar regulada por un par de genes; sin embargo también se ha reportado (Leyna *et al.*, 1982) que el control de este carácter es de tipo poligénico.

La base genética de la respuesta al fotoperíodo en frijol también fue investigada (Gu *et al.*, 1998) usando marcadores RAPDs en líneas endogámicas recombinantes (LERs). Los resultados indicaron que existen al menos dos loci que afectan la respuesta al fotoperíodo; el gen primario *Ppd*, que es un alelo dominante que confiere sensibilidad al fotoperíodo, y el gen *Hr* que determina el grado de la respuesta a este fenómeno

Existen otros estudios en donde se ha reportado que la respuesta al fotoperíodo está modulada por las condiciones ambientales y por la fecha de siembra. Al respecto, Padua y Munger (1969) señalan que la respuesta al fotoperíodo está modulada por la temperatura; en un estudio hecho con las variedades Red Kidney y Great Northern-1, determinaron el

tipo de herencia simple. En el primer caso, la sensibilidad al fotoperíodo fue condicionada por el gen dominante *Ht* mientras que en la segunda variedad por el gen *Lt*. Por otra parte Leyna *et al.* (1982), indicaron que la respuesta al fotoperíodo en lugares frescos fue de tipo monogénico, mientras que en los lugares cálidos fue de tipo poligénica.

En un estudio (Kornegay *et al.*, 1993) utilizando cruzamientos con materiales mesoamericanos por andinos, determinaron que la herencia a la sensibilidad, fue controlada por dos genes dominantes y la respuesta neutral por epistasis recesiva.

2.5. Estrategias de análisis de la respuesta al fotoperíodo

En el estudio de la respuesta al fotoperíodo en frijol común se han utilizado diferentes estrategias de acuerdo al desarrollo tecnológico. De manera general podemos dividir estos estudios en dos grandes subgrupos: los que han utilizado los procedimientos convencionales y aquellos que han incorporado herramientas biotecnológicas como es la tecnología de marcadores genéticos moleculares.

2.5.1. Estudios convencionales

La inducción de la floración requiere de las siguientes condiciones: que la planta haya rebasado su etapa juvenil para responder al síndrome de florecimiento, y que reciba un fotoperíodo adecuado para la especie (Martínez, 1989). En este sentido el estudio de la respuesta al fotoperíodo se ha hecho con base en criterios cualitativos y cuantitativos; en el primer caso, el criterio es definido cuando la planta ha formado una o más estructuras florales; en el segundo, el criterio cuantitativo considera además el tiempo y la cantidad de estructuras florales (Gaytán, 1990). De acuerdo a lo anterior, existen diferentes

procedimientos para el estudio de la floración como medida de la respuesta al fotoperíodo en los cuales se han incluido variables como el tipo de clima y las fecha de siembra.

Saad (1970), observó que en una variedad de *Phaseolus vulgaris* de origen peruano las yemas florales fueron inhibidas por fotoperíodos largos. También comprobó que mientras el frijol estuvo expuesto a fotoperíodos cortos (11 hrs.), abrió 55 flores, y cuando se expuso a fotoperíodos largos (16 hrs) se inhibió el desarrollo en la inflorescencia. En un estudio similar indica que una planta sometida a días largos tuvo emergencia de las hojas, pero el desarrollo de las yemas florales se inhibió ocurriendo lo contrario cuando la planta se sometió a días cortos. De igual manera Ojehomon (1973), utilizando dos fotoperíodos con baja intensidad incandescente o luz natural con duraciones de 11 y 15 horas, respectivamente; los resultados mostraron un promedio de 98% de yemas florales por planta en el primer caso; en el segundo experimento únicamente hubo 33% de yemas florales por planta.

En un experimento con temperaturas contrastantes, se determinó que éstas en combinación con el fotoperíodo afectaron el tiempo de floración del frijol. Las más cálidas aceleraron la floración y madurez fisiológica, mientras que las bajas el efecto fue contrario en las variedades sensibles. Por lo anterior se señala que la respuesta al fotoperíodo es más crítica en áreas cálidas que en áreas templadas (CIAT (1985), citado por Esquivel, 1999).

La respuesta del frijol al día largo juega un papel muy importante en el control del inicio y desarrollo de la floración. Por otra parte, Kretchmeret *et al.* (1977) indican que los genotipos neutrales son deseables en programas de mejoramiento genético ya que son plantas con una amplia adaptación. La aplicación práctica en fitogenética de esta reacción fisiológica es la de forzar variedades a que florezcan en un medio distinto al de su hábitat natural. De esta manera, es posible lograr el cruzamiento entre variedades o especies

distintas que de otro modo no coincidirían en su floración y por ende no sería posible cruzarlas (Brauer, 1976).

En el Altiplano de México el fotoperíodo de más de 13 h y la temperatura promedio mensual por arriba de los 18 °C ocurridos durante los meses de Mayo y Junio, retrasaron el inicio de la floración en fechas de siembra tempranas (Mayo), mientras que en fechas tardías (fines de Julio), la baja temperatura (<17.3 °C) retrasó la madurez fisiológica y redujo el rendimiento de semilla, aunque no de manera uniforme para todas las variedades estudiadas (Acosta *et al.*, 1997).

En Colombia, se evaluaron 250 variedades y líneas de frijol en cinco ambientes con amplitud de 13 a 27 °C de temperatura media anual, se observó que en los lugares más calurosos los rendimientos más altos se asociaron a materiales con respuesta neutral al fotoperíodo y en los lugares más fríos a materiales sensibles. El rendimiento promedio más bajo se obtuvo en el lugar con 13 °C y el más alto en el de 24 °C. En Davis California, con días de 15 horas luz también se alcanzaron los mayores rendimientos con los materiales neutrales; en contraste en Chíncha Perú, con días de 10 a 13 horas los genotipos sensibles fueron mejores (Masaya y White, 1991).

En el Altiplano de México, en fechas de siembra retrasadas con temperaturas medias relativamente bajas también se observó una disminución en la acumulación de biomasa y sus componentes (Esquivel, 1995; Hernández, 1995).

2.6. Tecnología de marcadores moleculares

Con la integración de la tecnología de marcadores moleculares a los programas de mejoramiento convencional la limitante de la selección fenotípica puede ser superada. Con el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se han desarrollado herramientas que pueden ser utilizadas para el análisis, caracterización y evaluación de la diversidad genética. (Guillén, 2000). En la última década se han desarrollado una gran variedad de marcadores moleculares en el nivel del ADN, cada uno de ellos con características propias y con diferentes requerimientos técnicos y potencialidades.

2.6.1. Polimorfismo en el ADN Amplificado por Secuencias Aleatorias (RAPDs)

La técnica de RAPDs (Williams *et al.*, 1990) está basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y no requiere conocimiento previo de la secuencia del ADN, y es aplicable a cualquier especie. En esta técnica, descrita en la Figura 1, se usan iniciadores arbitrarios cortos (usualmente decámeros) para amplificar múltiples segmentos del ADN genómico, la mayoría de esos segmentos son iguales entre individuos o razas; sin embargo, algunos se presentan en unos individuos pero no en otros. De esta forma es posible encontrar un gran número de marcadores que detectan polimorfismo en un corto tiempo.

Los marcadores RAPDs se han utilizado para el etiquetado de genes mayores en: cebada (Barua *et al.*, 1993), en frijol común (Haley *et al.*, 1993; Johnson y Gepts, 1994; Johnson *et al.*, 1994; Jung *et al.*, 1994; Miklas *et al.*, 1993), en lechuga (Kessili *et al.*, 1992; Michelmore *et al.*, 1991; Paran *et al.*, 1991), en avena (Penner *et al.*, 1993), en arroz (Mohan *et al.*, 1994), en tomate (Klein-Lankhorts *et al.*, 1991b; Martín *et al.*, 1991; Williamson *et al.*, 1994) y en trigo (Schachermayr *et al.*, 1994). También se han utilizado en estudios de diversidad genética en frijol común (Gepts y Bliss, 1985; 1986).

El uso de este tipo de marcadores se ha expandido a la identificación de genes de resistencia a enfermedades en cultivos hortícolas como es el caso de identificación de marcadores para resistencia a la roya en frijol común (Haley *et al.*, 1993; Miklas *et al.*, 1993), en tomate para resistencia a *Pseudomonas syringae* (Martin *et al.*, 1991) y en lechuga (Michelmore *et al.*, 1991). De la misma manera se han empleado en la estrategia de piramidación de genes en frijol común (Paran *et al.*, 1991; Miklas *et al.*, 1993; Haley *et al.*, 1993).

Finalmente, como ya se mencionó antes este tipo de marcadores también se han utilizado en estudios para determinar la respuesta al fotoperíodo en frijol común. Al respecto, Gu *et al.* (1993, 1994, 1995, 1998), identificaron dos marcadores RAPDs relacionados con la respuesta al fotoperíodo; el primero de ellos (*Ppd*) ligado a la neutralidad al fotoperíodo, el segundo es un marcador del gen (*Hr*) que interacciona con el gen *Ppd* para conferir una sensibilidad extrema al fotoperíodo.

2.6.2. Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSRs)

Las ISSRs (Zietkiewicz *et al.* 1994) son un tipo de marcadores de ADN que involucra el uso de secuencias microsatélite directamente en la PCR para hacer amplificaciones de ADN (Gupta *et al.* 1994; Zietkiewicz *et al.* 1994). Esta técnica posibilita la amplificación de ADN genómico y proporciona información sobre muchos loci de manera simultánea. Las ISSRs se han propuesto como una nueva fuente de marcadores genéticos que superan las limitaciones técnicas de los RFLPs y de las SSRs. Ratnaparkhe *et al.* (1998), fue el primero en demostrar que los marcadores ISSRs son útiles en estudios de etiquetado de genes y que pueden ser usados para identificar marcadores ligados a genes de interés. En la Figura 2, se presenta de manera esquematizada esta técnica. Esta clase de marcadores se han utilizado

para el análisis de diversidad genética en granos de maíz (Kantety *et al.* 1995), determinación de huellas genéticas en cítricos y papa (Fang *et al.* 1997; Prevost y Wilkinson 1999) y, en evaluación somaclonal en tejido de papa (Albani *et al.*, 1998), entre otros estudios.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Material Genético

Para medir la respuesta al fotoperíodo se utilizó una población de 45 líneas endogámicas recombinantes (LERs) F_{10} obtenidas de la cruce de Pinto Villa x Carioca, además de sus líneas progenitoras. Pinto Villa es una variedad criolla del norte de México que fue obtenida por introducción y selección. La variedad Carioca (II 925-M-29-1/Canario 101/Pinto Mexicano 4/2 II25-D-M-34-U), fué obtenida por hibridación y selección. De manera adicional se incluyeron en el estudio dos líneas isogénicas de la variedad Pinto Nacional; PN1 y PN1-1, sensible y neutral en su respuesta al fotoperíodo, respectivamente. Esta variedad fue obtenida mediante selección masal en una variedad criolla en Palmital, Sao Paulo, Brasil.

Todos los genotipos utilizados en el presente trabajo fueron proporcionados por el Dr. Jorge A. Acosta Gallegos, Líder Nacional del Programa de Frijol del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). En el Cuadro 1 se presentan algunas de las características más importantes de las líneas progenitoras utilizadas en el presente estudio además de la descripción de la variedad Pinto Nacional de donde se obtuvieron las isolíneas respectivas.

3.2. Análisis fenotípico

La respuesta al fotoperíodo se evaluó bajo condiciones de invernadero en las instalaciones del Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX). Para medir la

respuesta al fotoperíodo, las semillas de cada genotipo se sembraron en invernadero bajo dos tratamientos artificiales de duración del día, 10 y 16 horas.(Cuadro 1A del Apéndice).

Cuadro 1. Descripción de algunas características de las líneas progenitoras Pinto Villa, Carioca y Pinto Nacional.¹

Característica	Pinto Nacional	Pinto Villa	Carioca
Color de hipocotilo	Verde	Verde	Verde
Días a floración	43	42	55
Color de la flor	Blanca	Blanca	Blanca
Respuesta al fotoperíodo	Sensible	Sensible	Neutral
Hábito de crecimiento	² IP Tipo III	² IP Tipo III	³ IS Tipo III
Altura de la planta (cm)	35	35	43
Color de la vaina	Verde Medio	Verde medio ⁴ PR	Verde Medio
Días a la madurez	105	95 - 105	112
Ciclo biológico	Intermedio	Intermedio	Tardío
Color de grano	Crema listado de Cafe	Crema listado de Cafe	Crema rayado de cafe
Dehiscencia	Resistente	Resistente	Tolerante
Rendimiento (kg/ha ⁻¹)	1000	1452	1500
Peso de 100 semillas (g).	37.5	35	21.5

¹ Información proporcionada por el M.C. Rigoberto Rosales Sema, investigador del programa de frijol del Campo Experimental Valle de México, mediante comunicación personal.

²Indeterminado postrado; ³IS=Indeterminado semierecto

⁴Pigmentación roja

En el tratamiento de día corto, las plantas se cubrieron, a partir de la germinación, con un plástico negro montado en una estructura metálica de 2 m de altura. Estas se descubrían y cubrían diariamente a las 8:00 y 18:00 horas, respectivamente.

En el tratamiento de día largo, se proporcionó a las plantas, además de luz natural, luz artificial adicional de las 18:00 a las 23:00 horas. Para alargar el día se utilizaron lámparas incandescentes con dos tipos de luz, amarilla y blanca, las cuales se colocaron en

la parte superior del invernadero a dos metros de las plantas; la luz de las lámparas proporcionó un equivalente de $600 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en la parte superior del dosel vegetal.

Las plantas se cultivaron en macetas de cinco litros de capacidad con una mezcla de suelo (Molisol, clasificación FAO-UNESCO) y 'peat moss' (3:1). Se sembraron cuatro semillas por maceta y después de la emergencia se dejaron dos plántulas en cada una. Antes de la siembra y a intervalos regulares cada tres semanas las plantas fueron fertilizadas con dos gramos del fertilizante comercial 17-17-17 (N-P-K). Durante la conducción del experimento, el cual se terminó a los 100 días después de la siembra, se aplicaron a las plantas agua dos veces por semana y los agroquímicos necesarios para el control de mosquita blanca.

El carácter que se midió en cada planta fue el tiempo transcurrido desde la siembra hasta la aparición de la primera flor (días a floración). Se consideraron como plantas sensibles al fotoperíodo aquellas cuyo valor de días a primera flor estuvo entre 61 y 100 días; las plantas neutrales fueron las que tuvieron valores comprendidos entre 1 y 60 días.

El diseño experimental empleado fue de bloques completamente al azar, cuatro macetas por genotipo, dos para cada tratamiento. Los genotipos se distribuyeron al azar en bancales del invernadero y cada tres semanas se cambiaron de posición para evitar efectos de sombreado u otro tipo de interferencia con el desarrollo normal de las plantas.

3.3. Análisis genotípico

Para el aislamiento del ADN genómico se cosecharon hojas jóvenes sin áreas necróticas y se colocaron en bolsas de malla de fibra de vidrio junto con una etiqueta que identificó la muestra, las bolsas se colocaron en un recipiente con hielo. Las hojas se

colocaron en un recipiente de unicel y se les agregó nitrógeno líquido para congelar rápidamente a una temperatura de $-176\text{ }^{\circ}\text{C}$ aproximadamente. Las muestras congeladas se transfirieron al liofilizador (Lyph Lock 12.5 Lt Labconco) a temperatura baja ($-60\text{ }^{\circ}\text{C}$), la presión de vacío fue de menos de 10 micrones Hg. Las muestras se liofilizaron por 72 horas para finalmente ser conservadas en bolsas de plástico a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación se molieron las hojas en un molino para café marca Moulinex hasta obtener un polvo fino, las muestras se almacenaron en viales de plástico a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización

El procedimiento de aislamiento del ADN se basó en el método de Saghai-Maroo *et al.* (1984). Para ello se utilizaron 400 mg de polvo fino de tejido liofilizado de cada uno de los genotipos sometidos al análisis genético.

La cuantificación del ADN se llevó a cabo por espectrofotometría de luz ultravioleta en un espectrofotómetro marca HACH modelo AFB 0912H, a una absorbancia de 260 nanómetros. La concentración de cada muestra de ADN se determinó de acuerdo a la siguiente relación:

$$[\text{ADN (ng/ml)}] = (\text{DO}_{260})(\text{FD})(50\text{ng/ml}^{-1})$$

donde:

DO_{260} = Densidad óptica de la solución de ADN leída a una longitud de onda de 260 nm

FD = Factor de dilución

50 ng. ml^{-1} = Una unidad de densidad óptica del ADN a 260 nm.

A partir de la solución de ADN se preparó una dilución a 10 ng/ml que se usó como solución de trabajo. La pureza se evaluó como la proporción de las lecturas a longitudes de onda de 260 y 280 nm (260/280); en donde los valores entre 1.8 y 2.0 indican ADN relativamente puro, mientras que valores menores de 1.8 indican contaminación por proteínas y valores mayores de 2.0 indican contaminación por fenol o alguna otra sustancia orgánica.

Para verificar la calidad del ADN se prepararon geles al 0.7% de agarosa con solución de TBE 1X (Trizma base, EDTA 0.5 M, pH 8.0). La pureza se determinó de manera cualitativa al comparar las bandas del ADN de cada muestra con la banda del ADN del fago λ , del cual se colocaron en el gel 100 ng. Finalmente todas las muestras de ADN fueron estandarizadas a una concentración de 200 ng μL^{-1} .

3.3.1. Técnicas de análisis molecular

En el presente estudio se utilizaron dos técnicas de marcadores genéticos moleculares para hacer el análisis genético: los llamados polimorfismo de ADN amplificado aleatoriamente (RAPDs, por sus siglas en inglés) y las denominadas intersecuencias de repetición simple (ISSRs, por sus siglas en inglés).

3.3.1.1. Marcadores RAPDs

Con el fin de detectar polimorfismo se hicieron amplificaciones de fragmentos del ADN de las 45 LERs F10, los progenitores Pinto Villa y Carioca, las isolíneas PN1 y PN1-1 y de dos mezclas de ADN de las LERs: una mezcla estuvo compuesta de muestras de ADN de 10 LERs sensibles al fotoperíodo y la segunda de 10 con respuesta neutral. Las

mezclas se usaron para detectar si había algunos marcadores indicadores asociados a sensibilidad o neutralidad al fotoperíodo. La detección del polimorfismo incluyó la prueba de 273 iniciadores decámeros sintetizados por Operon Technologies Inc. Los iniciadores que mostraron bandas polimórficas características de cada mezcla segregante y que además detectaron polimorfismo entre las líneas progenitoras se utilizaron en la población de 45 LERs F₁₀, la metodología seguida con este tipo de marcadores es la descrita por (Michelmore *et al.* 1991);(Cuadro 2A del Apéndice).

3.3.1.1.1. Condiciones de amplificación

Los componentes de reacción para un volumen final de 20 µL fueron: amortiguador de Taq polimerasa 1X (MgCl₂, 2mM), dNTPs (187 mM c/u), taq polimerasa de GIBCO BRL (1U); Iniciador (10 ng/µL) y ADN templado (20 ng/µL). La amplificación se hizo en un termociclador Ericomp Deltacycler II. El programa de amplificación se muestra en la Figura 1.

3.3.1.1.2. Separación y detección de amplicones

Los productos amplificados se separaron sometiéndolos a electroforesis en geles de agarosa ultrapura de GIBCO BRL a una concentración del 2%. La separación de los amplicones se llevó a cabo en un sistema horizontal de electroforesis con cámara Horizon 20.25 de GIBCO BRL, la corrida se hizo durante 3.5 horas a 80 Volts. Una vez separados los amplicones el gel se trató con 1L de una solución de bromuro de etidio de 10 mg ml⁻¹ durante 20 minutos en agitación suave constante, después se hizo un lavado del gel con

agua destilada durante 20 minutos. Para la comparación de los fragmentos utilizados se utilizó como referencia el fago *PhiX174/HaeIII*. Los fragmentos amplificados fueron observados mediante un transiluminador de luz ultravioleta Fotodyne para finalmente tomar fotografías de los geles con equipo Polaroid.

3.3.1.2. Marcadores I-SSRs

Con esta clase de marcadores se utilizaron 41 iniciadores sintetizados por GIBCO BRL, en el Cuadro 3A se indican las características de cada iniciador. Los iniciadores que detectaron polimorfismo entre las líneas progenitoras fueron probados con cada una de las 45 LERs F_{10} para amplificar las 45 LERs así como las dos isolíneas utilizadas en este trabajo.

3.3.1.2.1. Condiciones de amplificación

Los componentes de reacción para un volumen final de 20 μ L fueron: amortiguador de polimerasa 1X (2 mM de $MgCl_2$), dNTP's (187 μ M c/u), 1U de Taq polimerasa de GIBCO BRL y ADN templado (20 ng). La amplificación se hizo en un termociclador Ericomp Deltacycler II. Las condiciones de amplificación son las que se presentan en la Figura 2. La separación y detección de los productos de amplificación con este tipo de marcadores fue similar a la que se describió para los marcadores RAPDs.

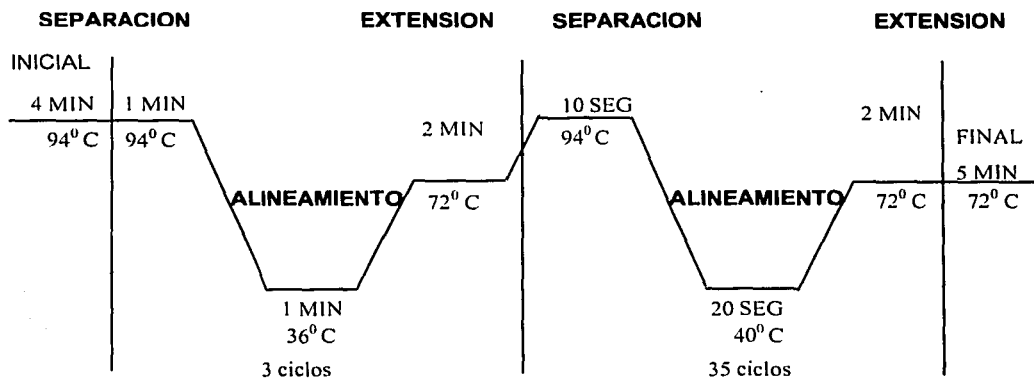


Figura 1. Programa de amplificación para marcadores RAPDs.

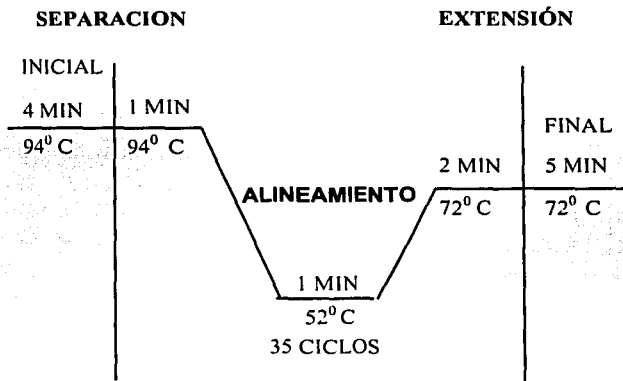


Figura 2. Programa de amplificación para marcadores ISSRs.

3.3.1.3. Análisis de la información

La captura de datos moleculares se hizo mediante codificación binaria de unos (presencia de bandas) y ceros (ausencia de bandas), además de los días a floración de los progenitores y 45 LERs, se llevó a cabo por medio del programa Hyper Map Data (Hoisington y González-de-León, 1993). La interpretación y captura de los datos se verificó por medio de tres lectores independientes.

El análisis de la presencia de un QTL (Quantitative trait loci) fue hecho en las 45 LERs F_{10} , con los datos de la respuesta al fotoperíodo y con la información genotípica de los RAPDs e ISSRs. Se practicó un análisis de varianza de factor individual para cada locus mediante la comparación de medias de la respuesta al fotoperíodo y de las dos clases genotípicas para cada loci detectado. El análisis de regresión lineal simple para cada locus fue utilizado para calcular el coeficiente de determinación (R^2), como una medida de la proporción de la varianza fenotípica total explicada por cada uno de los marcadores utilizados. Para los análisis indicados se utilizó el procedimiento PROC GML del paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1998).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Respuesta al fotoperíodo.

La distribución y frecuencia de la floración de las 45 LERs F_{10} se presenta en la Figura 3, en ella se aprecia que en las cuatro repeticiones establecidas en el experimento la población de LERs presentó una distribución similar a la generada cuando se utilizó el promedio de días a floración del total de las repeticiones. Como se observa, la distribución obtenida en todos los casos fue de tipo discreto y presentando asimetría hacia neutralidad. También se muestra que existe segregación transgresiva hacia esta misma característica. Los resultados promedio obtenidos indican que el 73% (33) de las LERs fueron neutrales, mientras que sólo el 27% (12) mostraron sensibilidad al fotoperíodo. Estos resultados indican que existe una relación fenotípica de 3:1, que muestra una respuesta al fotoperíodo de la población estudiada y, medida como los días a floración, regulada por la acción de un gen. Al analizar el comportamiento de las líneas progenitoras, los resultados fueron los esperados; en el caso del progenitor Carioca, el cual es neutral al fotoperíodo, la floración se presentó a los 40 días de la emergencia; sin embargo existen LERs que alcanzaron la floración desde los 25 días a partir de la emergencia. La variabilidad mostrada por la población de LERs nos indica que es posible seleccionar individuos con mayor o menor precocidad y que estos individuos pueden ser utilizados en programas de mejoramiento genético.

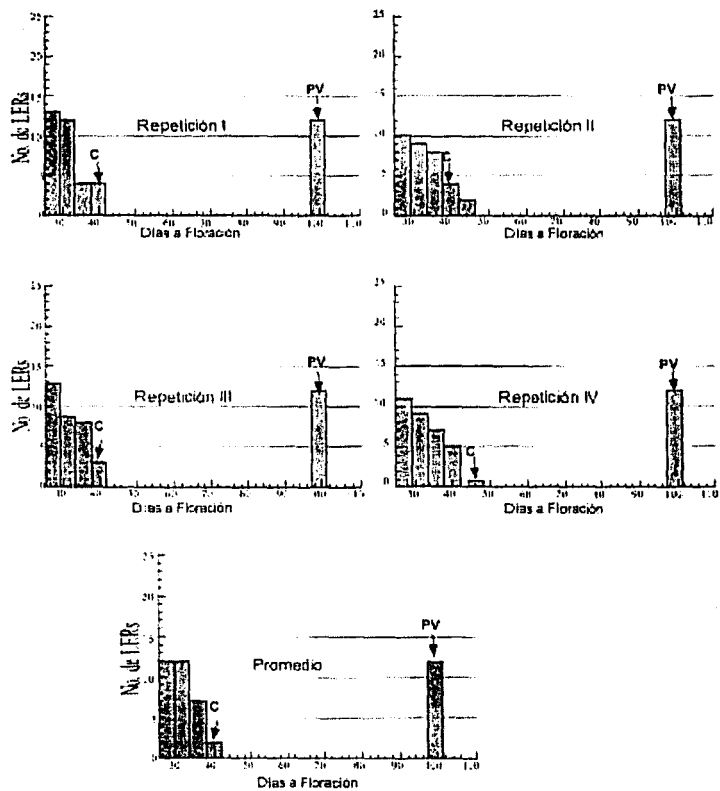


Figura 3. Frecuencia y distribución para días a floración de 45 líneas endogámicas recombinantes (LERs) F_2 de la población derivada de la cruce de Pinto Villa (PV) x Carioca (C); sensible y neutral al fotoperíodo, respectivamente.

4.2. Nivel de Polimorfismo

La tecnología de RAPDs incluyó el procedimiento de análisis de grupos de segregantes propuesto por Michelmore *et al* (1991), para esta técnica de marcaje los grupos de segregantes estuvieron compuestos por muestras de 10 líneas neutrales y otro similar pero con líneas catalogadas como sensibles. En las líneas progenitoras se probaron un total de 273 decámeros; de estos el 77% detectó diferencias. Posteriormente los iniciadores útiles fueron probados con las mezclas de ADN y con cada una de las diez líneas que constituyen cada grupo; de los 210 iniciadores probados en esta fase, solamente se identificaron 17 decámeros como indicadores de la respuesta diferencial al fotoperíodo y estos fueron los únicos probados con el total de la población de LERs.

En el Cuadro 2 se observa que el número de bandas obtenidas en la población de LERs con los 17 iniciadores fue de 208, con un promedio de bandas por iniciador de 12.24 y un porcentaje de polimorfismo del 34 %. El nivel de polimorfismo se obtuvo considerando el número total de bandas polimórficas detectadas tanto por los marcadores RAPDs como por los ISSRs.

Para el análisis mediante los I-SSRs se utilizaron 41 iniciadores, todos fueron probados con los progenitores. Del total, 35 de ellos detectaron diferencias entre las líneas progenitoras en al menos una banda. El promedio de bandas polimórficas detectadas en la población de LERs por iniciador fue de 11.31 y se detectaron en total 396 bandas con este tipo de marcadores. El polimorfismo obtenido de manera similar que con los RAPDs, fue del 66 %. Todos los resultados obtenidos sobre el nivel de polimorfismo se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Nivel de polimorfismo detectado con marcadores ISSRs y RAPDs entre las líneas progenitoras Pinto Villa y Carioca; sensible y neutral al fotoperíodo, respectivamente.

Marcador	Iniciadores Utilizados	No. de Bandas polimórficas	Polimorfismo Detectado (%)
En líneas progenitoras			
ISSRs	41	35	85
RAPDs	273	210	77
Total	314	245	78
En población de LERs F₁₀			
Marcador	Iniciadores Utilizados	No. de Bandas detectadas	Bandas detectadas (%)
ISSRs	35	396	66
RAPDs	17	208	34
Total	52	604	-

Al hacer la comparación entre el nivel de polimorfismo detectado por cada tipo de marcadores, los resultados indican que en el caso de los marcadores ISSRs y, no obstante haberse utilizado un número inicial significativamente menor (15%) con respecto a los marcadores RAPDs, se detectó al final del proceso mayor información en un tiempo y costo menor con respecto al obtenido con los marcadores RAPDs. Ya que al considerar el número total (52) de iniciadores en la población de LERs y el número total (604) de bandas detectadas los iniciadores ISSRs detectaron en promedio 7.62 bandas por 4.0 detectadas por los iniciadores RAPDs. Cabe destacar que en el caso de los marcadores RAPDs se utilizó el procedimiento descrito por Michelmore *et al* (1991) y que los 17 iniciadores de este tipo fueron seleccionados después de varias etapas de prueba, es decir, estos marcadores pasaron por varias etapas de selección antes de utilizarlos con la población de LERs. En general los resultados del nivel de polimorfismo detectado con ambos tipos de marcadores

coinciden con los reportados por otros autores que mencionan que la amplificación con marcadores ISSR puede revelar un número mucho mayor de fragmentos por iniciador con respecto al detectado con los RAPDs (Wolff *et al.*, 1995). La utilidad de los dos tipos de marcadores para la detección de polimorfismo como la base de cualquier análisis genético, coincide con lo reportado por otros autores que han usado marcadores RAPDs (Williams *et al.*, 1990; Welsh y McClelland, 1990; Caetano-Anolles *et al.*, 1991; Nadeau *et al.*, 1992) y marcadores ISSRs (Kantety *et al.* 1996; Tsumura *et al.* 1996; Fang y Rosse, 1997; Prevost y Wilkinson, 1999).

4.3. Identificación de marcadores ligados a la respuesta al fotoperíodo

Los resultados de análisis de regresión lineal simple efectuados con los datos moleculares y los datos fenotípicos para asociar la variación en el nivel de ADN con la variación en la respuesta al fotoperíodo, se presentan en el Cuadro 3.

Los 52 iniciadores utilizados en la población de LERs generaron un total de 604 loci-marcador (Cuadro 2); de estos, solamente ocho de ellos indicaron estar asociados con la respuesta al fotoperíodo, medida como los días a floración. No obstante lo anterior, al probarlos con las muestras de ADN de las isolíneas para fotoperíodo de Pinto Nacional, solamente dos de ellos fueron consistentes: el (TTC)₅RY-1, este locus marcador se asoció al carácter de sensibilidad al fotoperíodo es decir únicamente los genotipos de frijol sensibles al fotoperíodo presentaron la banda como se puede observar en la Figura 5. La varianza fenotípica explicada por este marcador fue del 19.3%. La presencia del segundo locus-marcador denominado IIVII(TCC)₅ también fue verificada en la isolínea con respuesta neutral al fotoperíodo de Pinto Nacional por lo que este locus-marcador fue

asociado al carácter neutral explicando un 14.8% de la varianza fenotípica total de la respuesta al fotoperíodo en la población de RILs. Los dos marcadores asociados al fotoperíodo son del tipo ISSRs. La segregación de los loci-marcadores identificados se puede observar en la Figura 4, para el caso de las líneas progenitoras y la población de LERs y, en la Figura 5 se presenta la segregación de los mismos loci-marcadores en las isolíneas de Pinto Nacional utilizadas para este propósito.

El resto de los loci-marcadores identificados en el análisis de regresión como ligados a la respuesta al fotoperíodo, estos no presentaron ninguna relación con el carácter cuando se probaron con las isolíneas, aun cuando en el caso de los obtenidos con iniciadores RAPDs, la varianza fenotípica total explicada varió de 16.84% hasta un 19.6% como en el caso del locus-marcador OPC15-1. Probablemente estos loci sean falsos positivos identificados en el análisis estadístico practicado.

Se han hecho algunos estudios para identificar marcadores ligados a la respuesta al fotoperíodo, en el presente estudio se incluyeron los dos marcadores RAPDs reportados por Gu *et al.* (1993,1994). Al ser probados con el ADN de los progenitores Pinto Villa y Carioca no se detectó polimorfismo entre ellos; estos resultados probablemente se deben a que los iniciadores reportados por este autor son específicos para la cruce de los genotipos que utilizó en su estudio. Los marcadores identificados como ligados al carácter de sensibilidad y neutralidad al fotoperíodo deberán probarse en un estudio posterior con diferente germoplasma de frijol que sea contrastante en su respuesta al fotoperíodo con la finalidad de verificar su utilidad en programas de selección facilitada por marcadores. Una vez hecho esto se estará en condiciones de seguir con el procedimiento de secuenciación de las bandas para finalmente diseñar el iniciador para su uso en programas de mejoramiento genético de frijol.

Cuadro 3. Valores de F, probabilidad y varianza fenotípica explicada (%) obtenidos para ocho marcadores moleculares en la población de 45 LERs F₁₀ de la cruz de Pinto Villa x Carioca.

Locus marcador	Valor de F	Probabilidad	Varianza Fenotípica Explicada (%)
Marcadores RAPDs			
OPC15-1	9.48	0.0038	19.6
OPM2-2	10.0	0.0039	18.9
OPA12-3	8.85	0.0048	17.4
OPO7-1	8.5	0.0057	16.84
Marcadores ISSRs			
(TTC) ₅ RY-1	9.58	0.0036	19.3
IIVII(TTC) ₅ -1	6.79	0.0013	14.8
(CA) ₈ RT-2	7.06	0.0012	14.7
WHVG (TG) ₇ -3	6.54	0.0141	13.21

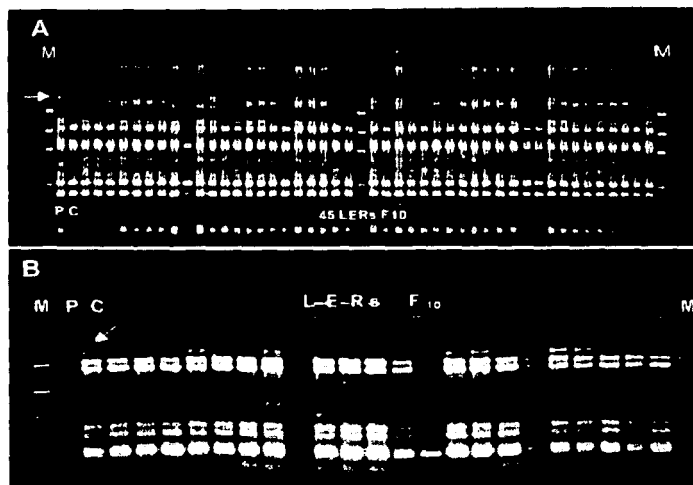


Figura 4. Polimorfismo detectado en las líneas progenitoras (Pinto Villa (P), Carioca (C) y líneas endogámicas recombinantes. Los iniciadores candidatos para marcadores de la sensibilidad (A) y para la neutralidad (B) al fotoperíodo son: $(TTC)_3RY-1$ y $IVII(TCC)_3$, respectivamente. Las flechas indican la banda asociada al carácter. El marcador (M) utilizado es $dV174/HaeIII$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

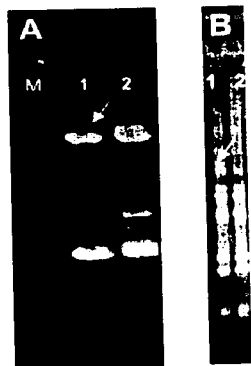


Figura 5. Polimorfismo detectado en las isolíneas de frijol para respuesta diferencial al fotoperíodo: Pinto Nacional-1 (1) y Pinto Nacional 1-1 (2); neutral y sensible al fotoperíodo, respectivamente. La flecha indica la banda asociada a la sensibilidad o a la neutralidad y detectados con los iniciadores: (TTC)₁RY-1 (A) y II_{VII}(TCC)₁ (B).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo de investigación se determinan por las condiciones experimentales en las que se desarrolló. Por lo que con base en los objetivos e hipótesis planteados se concluye lo siguiente:

La población de LERs F_{10} de la cruce de Pinto Villa por Carioca contiene líneas sensibles y neutrales al fotoperíodo y algunas líneas presentaron segregación transgresiva hacia el carácter neutral al fotoperíodo.

El control genético de la respuesta al fotoperíodo, medido como los días a floración, esta determinado por la acción de un gen.

La tecnología de ISSRs detectó un mayor polimorfismo con respecto al determinado por los RAPDs.

Se identificaron dos loci-marcadores ligados a la respuesta al fotoperíodo: el $(TTC)_5RY-1$ y el $IIVII(TTC)_5-1$ para sensibilidad y neutralidad, respectivamente.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Acosta D.E., R. Simón. J.A. Acosta G., A. Pajarito R., B. Cázares E., R. Ochoa M., y L. M. Serrano C. 1997.** Fenología y rendimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en tres fechas de siembra, en cuatro localidades de México En: Resultados de investigación en frijol 1994-1995. Proyecto colaborativo INIFAP-MSU (b/c-crsp). Acosta G., J.A. y R. Rodríguez G. (eds). Publicación especial Núm. 11. INIFAP. Durango, Dgo. México. 180-189 p.
- Acosta, J., D. Aguilera, M. Ochoa, M. Arrieta, y R. Rosales. 1990.** Resultados de investigación sobre frijol 1989. INIFAP-MSU. Publicación especial Núm.4. Campo Experimental ½Valle del Guadiana½ Durango, México.
- _____, and **J. White. 1995.** Phenological plasticity as an adaptation by common bean to rainfed environments. *Crop Sci.* 35: 199-204.
- Adams, W., D. Coyne, J.H. Davis, P.H. Graham and C.A. Francis. 1985.** Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: R.J. Summerfield and F.H. Roberts (Eds.). Grain legume crops. Collins, London Tropical, Cali, Colombia, 56 p.
- Albani, M. and M. Wilkinson. 1998.** Intersimple sequence repeat polymerase chain reaction for the detection of somaclonal variation. *Plant Breeding* 117: 573-575.
- Ayala, K. 1984.** Genética moderna, Fondo Educativo Interamericano, México. 836 p.
- Barua, V. M., K.J. Chalmers, C.A. Hackett, W.T.B. Thomas, W. Powell, and R. Waugh. 1993.** Identification of RAPD marker linked to a *Rhynchosporium secalis* resistance locus in barley using near isogenic lines and bulked segregant analysis. *Heredity* 71:177-184.
- Becerra, V. and P. Gepts. 1994.** RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in its centres of origin. *Genome* 37: 256-263.

- Beckmann, J. S. and M. Soller. 1990.** Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Bio/Technology* 8: 930-932.
- Bernier, G., J. Kinet and R.M. Sachs. 1985a.** *The Physiology of Flowering. Vol. I.* CRC. Press. 2a. Reimpresión 149 p.
- _____.
_____.**1985b.** *The Physiology of Flowering. Vol. II.* CRC. Press. 2a. Reimpresion 231 p.
- Bohinski, R. 1991.** *Bioquímica, 5a.,* editorial Addison-Wesley Iberoamericana, México, 739 p.
- Bonner Janes y Arthur W. Galston. 1961.** *Principios de Fisiología Vegetal,* editorial Aguilar, Madrid, 485 p.
- Brauer Oscar. 1976.** *Fitogenética Aplicada, 2ª,* editorial Limusa, México, 514 p.
- Braun J. 1979.** *Fitosociología bases para el estudio de las comunidades vegetales.* H. Blume ediciones, Madrid, 257 p.
- Caetano-Anolles, G., B.J. Bassam and P.M. Grshoff. 1991.** DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technmology* 9:553-557.
- Campos E. A. 2001.** Efecto del fotoperíodo y la temperatura en la fenología de familias segregantes de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México, 102 p.
- Cárdenas, F. 1984.** *Clasificación Preliminar de los frijoles en México, SARH, México,* 59 p.

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1988. Informe anual sobre frijol.Cali, Colombia.

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1999. Informe anual sobre frijol.Cali, Colombia.

Condit, R. and S.P. Hubbell. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34: 66-71.

Coote, T. and M. W. Bruford. 1996. Human microsatellites applicable for analysis of genetic variation in apes and old world monkeys. *The Journal of Heredity* 87 (5): 406-410.

Coyne D.P. 1978 b. Genetics of flowering in dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *Annals of Botany* 37:871-874.

D'Aquila, R., J. Bechtel, J. Videler, J. Eron, P. Gorczyca and J.C.Kaplan. 1991. Maximizing sensitivity and specificity of PCR by preamplification heating. *Nucleic Acids Research* 19 (3): 3749.

Devos, K.M., and D.M. Gale. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor Appl Genet* 84: 567-572.

Esquivel, E. G. 1995. Fenología, crecimiento y rendimiento de dos variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en seis fechas de siembra. Tesis de Licenciatura. UACH. Chapingo. México. 60 p.

_____, 1999. Efecto de la temperatura sobre la fenología, producción de biomasa y rendimiento de grano y sus componentes en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Tesis

Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo Texcoco México, 115 p.

Estadística Básica del Sector Agropecuario Dirección de Estudios Económicos. 1999.
(SAGAR).

Fang, D.Q., M.L. Roose. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor Appl Genet* 95: 408-417.

Fanjul, L. 1978. Analisis del crecimiento de una variedad de *Phaseolus vulgaris* L, de habito de crecimiento indeterminado y ensayo para el estudio de las relaciones entre la fuente y la demanda de los fotosintatos. Tesis de Maestro en Ciencias Colegio de Postgraduados, Chapingo, México, 139 p.

Gaytán, A. 1990. Respuesta al fotoperiodo en la floracion de cuatro cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Tesis de Maestro en Ciencias Colegio de Postgraduados , Montecillo, Texcoco, México, 86 p.

Goytia, Ma. 1996. Temperatura foliar como indicador de tolerancia a la sequía en frijol (*Phaseolus vulgaris* L) Tesis Maestro en Ciencias Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, México, 142 p.

Guillén A. H. 2000. Tecnología de marcadores moleculares y su aplicación al fitomejoramiento, UACH, parasitología agrícola, Chapingo, Estado de México.

Gupta, M., Chyi Y-S, Romero-Severson J.L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 89:998-1006.

Gepts P, Bliss F.A. 1985. F₁ hybrid weakness in the common bean. *J. Hered.* 76:447-450.

- _____, _____. 1986. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. *Econ Bot.* 40:469-478.
- Haley, S.D., Miklas, P. N., Stavely, J. R., Byrum, J., and Kelly, J.D. 1993.** Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. *Theor Appl. Genet.* 86:505-512.
- Hamann, A., D. Zink and W. Nagl. 1995.** Microsatellite fingerprinting in the genus *Phaseolus*. *Genome* 38:507-515.
- Hamner, K.C. 1969.** *Glicine max.* In: Evans (Ed) *The induction of flowering*. Melbourne, Australia 62-89 p.
- Hernández H. C. 1995.** Fenología y rendimiento de variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de diversos orígenes en tres fechas de siembra. Tesis de Licenciatura UACH. Chapingo. México, 78 p.
- Hogan , R., L. Hubert and J.W. Dudley. 1994.** A classification of 148 U.S maize inbreds II. Validation of cluster analysis based on RFLP's. *Crop Sci:* 34: 852-865.
- Hoishington, D.A. y González de León A. 1993.** Hyper Map Data – A Hyper Card stack for entry and analysis of molecular genetic segregation data. *Agronomy abstracts.* 1993. Annual Meeting, Cincinnati, Ohio, Nov. 7-12. 1993.
- Iglesias L. and R. Rojas. 1992.** Utilización del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) en los programas de mejoramiento genético de plantas. Revisión bibliográfica. *Cultivos Tropicales.* 13(1): 74-88.
- INEGI. 2000.** Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática. Boletín de Información Oportuna del Sector Alimentario No. 173.

Jeffreys, A.J., V. Wilson and L.T. Swee. 1985. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73.

_____, _____, **R. Neumann and J. Keyte. 1988.** Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: onwards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Research*. 16(23): 10953-10971

Jones, H.G. 1986. Plants and microclimate a quantitative approach to enviromental Plant Physiology 323 p.

Johnson, W.C. and Gepts.1994. Two new molecular markers linked to be 3. *Ann Rpt . Bean Improvement Coop.* 37:206-207.

_____, **P.N. Miklas, and J.R. Stavely. 1994.** The potential of coupling and repulsion phase RAPD markers for indirect selection of rust resistance progeny in common bean. *Ann Rpt. Bean Improv. Coop.* 37:81-82.

Jung, G., D.P. Coyne, P.W.Skroch, J. Nienhuis, E.Arnaud-Santana, J. Bokosi, S.M. Kaeppler, and J.R. Steadman. 1994. Construction of a genetic linkage map and locations of common blight, rust resistance and pubescence loci in *Phaseolus vulgaris* L. Using RAPD markers. *Ann. Rpt. Bean Improvement Coop* 37:37-38

Kantety, R.V., X. Zeng, L. Bennetzen and B.E. Zehr. 1995. Detection of high levels of polymorphism among dent and popcom inbred lines using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) amplification technique. *Maize Genetics Cooperation Newsletten* 69: 132-134.

Kaplan, L. and MacNeish, R.S. 1960. Prehistoric bean remains from Ocampo caves in the region of Tamaulipas, México. *Bot. Mus. Leafl Harv. Univ.* 19:33-56.

- Kesseli, R.V., I. Paran y R.W. Michelmore. 1992.** Efficient mapping of specifically targeted genomic regions and the tagging of these regions with reliable PCR-based genetic markers. *Crop Sci. Soc. Amer., Madison, Wis.* P. 31-36.
- Klein – Lankhorts, R.M., A. Vermunt, R. Weide, T. Liharska, and P. Zabel. 1991 b.** Isolation of molecular markers for tomato (*L. Esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theoretical Applied Genet* 83:108-114.
- Konegay Julia, Jeffrey W. White, Jerson R. Dominguez, Gerardo Tejada, Cesar Cajiao. 1993.** Inheritance of photoperiod response in Andean and Mesoamerican common bean. *Crop Science.* 33:1-8.
- Kijas, J., C.S. Fowler and M.R. Thomas. 1995.** An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within citrus and related species. *Genome* 38: 349-355.
- Kretchmer P. J., J.L. Ozbun, S.L. Kaplan, D. R. Laing, and D.H. Wallace. 1977.** Red and far-red light effects on climbing in *Phaseolus vulgaris* L. *Crop. Sci.* 17 (5): 797-799.
- Laing, D.R., P.G. Jones, y H. C. Davies. 1984.** Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Cap. 9. In: Goldsworthy, P.R., N.M. Fisher. (Ed.). 1984. *The physiology of Tropical Field Crops.* Jonh Wiley. Bath, Avon 305-359 p.p.
- Lee, M. 1995.** DNA markkers and plant breeding programs. *Advances in Agronomy* vol. 55: 265-344.
- _____, **G.A., Penner and K.M. Devos. 1995.** Characterization of loci containing microsatellite sequences among canadian wheat cultivars. *Genome* 38: 1037-1040.

Leyna, S.S. Kordan, and D.P. Coyne. 1982. Changes in patterns of inheritance of flowering time of dry beans in different environments. *J. Hered.* 73(4):306-308.

Liscum, E. and R.B. Winslow . 1995. Mutation in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *The Plant Cell* 7: 473-485.

Loaiza, J.M. 1986. Crecimiento y aprovechamiento de la energía solar del maíz (*Zea mays* L.) en asociación con frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Tesis de Maestro en Ciencias Colegio de Postgraduados, Chapingo, México, 150 p.

Market, C.L. and Moller. 1959. Multiple forms of enzyme: tissue ontogenic and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 45: 753-763.

Martin, G. B., J.G.K. Williams, and S.D. Tanksley. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2336-2340.

Martínez, D.G. 1989. Estudio de fotoperíodo en la floración de *Simsia amplexicaulis* (cav) pers. Tesis Maestro en Ciencias Colegio de Postgraduados. Centro de Botánica, Chapingo, México, 125 p.

Masaya and J.W. White. 1986. Effects of short days on stem elongation in some indeterminate dry bean cultivars adapted to the tropics. *Annu. Rep. Bean. Improv. Coop.* 29: 1-3.

_____, _____, **1991.** Adaptation to photoperiod and temperature in: *Common Beans Research for Crop Improvement* van Schoonhoven, A & O. Voysest (eds). C.A.B. International. CIAT, Cali, Colombia 1-980 p.

Michelmore, R.W., I. Paran and R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect

markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Genetics* 88: 9828 - 9832.

Miklas, P. N., Stavely, J. R., and Kelly, J. D. 1993. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 85:745-749.

Miranda, S. 1990. Identificación de las especies cultivadas del género *Phaseolus*. Centro de genética, Colegio de Postgraduados Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Caracterización molecular y morfológica de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.). Chapingo, Estado de México, 111 p.

Mmopi, S., R. Rodríguez, D.H. Wallace, P.N. Masaya, and R. W. Zobel. 1995. Control of days to flowering of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by interaction of a photoperiod gene and a nonphotoperiod gene. In: Handbook of plant and Crop Physiology. Pessarakli, M. (ED.). The University of Arizona, Tucson, Arizona. Marcel Dekler, Inc. New York Basel. Hong Kong. p.p. 917-939.

Mohan, M., S. Nair, J. S. Bentur, V. P. Rao, and J. Benett. 1994. RFLP and RAPD mapping of the rice Gm2 gene that confers resistance to biotype I of gall midge (*Orseolia oryzae*). *Theoretical Applied Genet.* 87:782-788.

Montalvo, L. 1998. Caracterización molecular y morfológica de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.). UACH., Chapingo, México, 113 p.

Morgante, M. and A.M. Olivieri. 1993. PCR - amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* 3 (1): 175-182.

Nadeau, J. H., Bedigian, H.G., Bouchad, G. Denial, T. Kosowski M., Norbert, R., Pugh, S., Sargeant, E., Tumer, Rr., and Paigen. 1992. Multilocus markers for

mouse genome analysis PCR amplification based on single primers of arbitrary nucleotide sequence Mamm. Genome 3:55-64.

Nagaoka, T. and Y. Ogihara. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers .Theor Appl Genet 94: 597-692.

Nakamura, Y., M. Leppert, P. O'Connell., R. Wolff, T. Holm, M. Culver, C. Martin, E. Fujimoto, M. Hoff, E. Kumlin and R. White. 1987. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. Science 235: 1616-1622.

Ojehomon, O.O. 1973. The effect of photoperiod on flower bud. Development in *Phaseolus vulgaris* L. Annals of Botany. 37:871-884.

Padda, D.S. and H. M. Munger. 1969. Photoperiod, Temperature and Genotype Interactions Affecting Time of Flowering in Beans. *Phaseolus vulgaris* L. J. Am. Soc. Hort. Sci. 94(2):157-160.

Paran, I., R. V. Kesseli, and R. W. Michelmore. 1991. Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. Genome 34:1021-1027.

Penner, C. A., J. Chong, M. Levesque-Lemay, S. J. Molnar, and G. Fedak. 1993. Identification of a RAPD marker linked to oat stem rust gene Pg3. Theoretical Applied Genet. 85:702-705.

Prevost, A., M.J. Wilkinson. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theor. Appl. Genet 98: 107-112.

- Rafalski, J.A., S.V Tingey, and J.G.Williams. 1991.** RAPD markers a new technology for genetic mapping and plant breeding. *Research News and Information*. 3(4): 645-648.
- Ratnaparkhe, M.B., M. Tekeoglu , F.J. Muehlbauer. 1998.** Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theor Appl Genet* 97: 515-519.
- Richter, G. 1982.** *Fisiología del metabolismo de las plantas*, editorial Continental, 4a, México, 417 p.
- Ruíz, V. J. 1984.** Soybean phenology and yields influenced by environment and management factors. Ph. D. Thesis.Iowa State Univrsity. Ames, Iowa. 171 p.
- Saghai-Marooif, K.M. Soliman, R.A. Jorgensen and R.W. Allard. 1984.** Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and populaion dynamics. *P.N.A..S.* 81: 8014-8018.
- Sahagún, C.J. 1997.** Uso de los marcadores moleculares en el mejoramiento genético vegetal. *Publicaciones del Programa Nacional de Etnobotánica. Serie: Fitodomesticación No. 6 UACH. Chapingo, México, 111p.*
- Salisbury, F.B., and C.W. Ross. 1994.** *Fisiología vegetal*. Trad. de la cuarta ed. del inglés por V. González V. Grupo Edit. Iberoamérica. México, D.F. 759 p.
- Schachermayr G, H. Siedler, M. D. Gale, H. Wineeler, M. Wineeler, and B. Keller. 1994.** Identification and localization of molecular markers linked to the Lr9 leaf rust resistance gene of wheat. *Theoretical Applied Genet.* 88:110-115.

- Sheri K., E. Ronald and G. Scandalios. 1993.** Concentration of primer and template qualitatively affects products in random-amplified polymorphic DNA PCR. *Biotechnology* 14(3): 362-364.
- Smith, J.S. and O.S. Smith. 1992.** Fingerprinting. crop varieties advances in agronomy 47: 85-140.
- Solórzano, E. 1994.** El cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Editorial Dpto. de Fitotecnía, UACH, Mpio. de Texcoco, México, 498 p.
- Soltis, D.E. and P.S Soltis. 1989.** Isozymes in plant biology. Department of Botany. Advances in Plant Science series vol.4 Washington State University. USA. 268 p.
- Stefan, K. and B.M. Kenneth. 1991.** A novel rapid method for detection of PCR products. *Nucleic Acids Research* 19(14): 4012.
- Tingey, S.V. and J.P. Tufo. 1993.** Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiol.* 101: 349-352.
- Tsumura, Y., K. Ohba and S.H Strausss. 1996.** Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor Appl Genet* 92: 40-45.
- Valadéz, M.E. and G. Kahl. 1997.** Análisis del genoma vegetal amplificación de las huellas del ADN. Apuntes del tercer curso internacional de biotecnología aplicada al mejoramiento genético vegetal. Módulo I. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México 121 p.
- Vallejos, E., S. Ney, Sakiyama and D. Chase. 1992.** A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics* 131: 733-740.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans and Theo van de Lee. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23(21): 4407-4414.

Voyset, O. 1983. Variedades de frijol en América Latina y su origen. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 87 p.

Wallace, D.H. 1985. Physiological genetics of plant maturity. Adaptation and yield. *Plant Breeding Reviews* 3: 21-167.

Wallace, D.H., K.S. Yourstone, P.N. Masaya, and R.W. Zobel. 1992. Photoperiod gene control over partitioning between reproductive and vegetative growth. *Theor Appl Genet* 86: 6-16.

Wallace, K. S. Yourstone, P. N. Masaya and R. W. Zobel. 1993. Photoperiod gene control over partitioning between reproductive and vegetative growth. *Theor Appl Genet*. 86: 6-16.

_____, 1995 b. Photoperiod x Temperatura interaction effects on the Days to flowering of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Handbook of plant and crop physiology. Pessarakli, M. (ed.). The University of Arizona, Tucson, Arizona. Marcel Dekker, Inc. New York. Bosel. Hong Kong. 863-891.

W. K. Gu, N. F. Weeden, J. Yu, D. H. Wallace. 1993. A DNA marker for *ppd*, a gene conferring insensitivity to photoperiod in common bean. *Annu Rep Bean Improv Coop*. 36: 1-2.

_____. 1994. Identification of a DNA marker for *Hr*, a gene that interacts with *Ppd* to confer extreme photoperiod sensitivity in common bean. *Annu Rep. Bean Improv Coop* 37:125-126

- _____, _____, _____, _____. **1995.** Large-scale, cost-effective screening of PCR products in marker-assisted selection applications. *Theor Appl Genet.* 91:465-470.
- _____, **JiaQuian Zhu, Donald H. Wallace. 1998.** Analysis of genes controlling photoperiod sensitivity in common bean using DNA markers. *Euphytica.* 102:125-132.
- Welsh, J. And M. McClelland, 1990.** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6535.
- White, J.W. and D.R. Laing. 1989.** Photoperiod response of flowering in diverse genotypes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Res.* 22: 113-128.
- Williams, G.K., A. Kubelik, K. Livak, J. Rafalski and V. Tingey. 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Research* 18 (22): 6531-6535.
- Williamson, V. M., J.-Y. Ho, F. F. W, N. Miller, and I. Kaloshian.1994.** A PCR based marker tightly linked to the nematode resistance gene, Mi, in tomato. *Theoretical Applied Genet* 87:757-763.
- Wolff, K., E. Zietkiewicz and H. Hofstra. 1995.** Identification of chry santhemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. *Theor Appl Genet* 91: 439-447.
- Yang, W., A. Oliveira, I. Godwin, K. Schertz and J. Bennetzen. 1996.** Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: Variability in Chinese Sorghums. *Crop Sci.* 36: 1669-1676.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994.** Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

VII. APENDICE

Cuadro 1A. Días a floración con tratamiento de 10 y 16 horas

Líneas endogámicas recombinantes	Promedio día corto	Promedio día largo
Pinto Villa	29.5	100
Carioca	42	40
1	39.5	35
2	26	26.5
3	28.5	28.3
4	32.5	30
5	40	38.3
6	37	34.3
7	36.5	29.5
8	39.5	100
9	33	100
10	26.5	100
11	33	100
12	28.5	26.8
13	32.5	100
14	35	24.8
15	32	28
16	30.5	24.5
17	32.5	24.8
18	34.5	33.5
19	34	32
20	34	32.8
21	35	36
22	36	36.3
23	38.5	37.3
24	36	100
25	32.5	100
26	30	26.8
27	26.5	27.3
28	29	100
29	27	100
30	37	28.5
31	30	32.5
32	34.5	31.8
33	31.5	31.5
34	31	31.8
35	28	100
36	25	100
37	32.5	35.3
38	26.5	32.8
39	32	30.3
40	30.5	31.5
41	27.5	30.3
42	26	28
43	36.5	42.5
44	34.5	38
45	35	100

Cuadro 2A. Características de los Iniciadores RAPDs.

Número	Nombre	Secuencia
99	OPE-19	ACGGCGTATG
55	OPC-15	GACGGATCAG
206	OPL-06	GAGGGAAAGAG
207	OPL-07	AGGCGGGAAC
222	OPM-02	ACAACGCCTC
208	OPL-08	AGCAGGTGGA
209	OPL-09	TGCGAGAGTC
179	OPJ-19	GGACACCACT
219	OPL-19	GAGTGGTGAC
223	OPM-03	GGGGATGAG
232	OPM-12	GGGACGTTGG
233	OPM-13	GGTGTC AAG
234	OPM-14	AGGGTCGTTT
246	OPN-06	GAGACGCACA
272	OPO-12	CAGTGCTGTG
400	OPU-20	ACAGCCCCCA
P5b	P5b	TCTCTGTCCC

Cuadro 3A. Características de los iniciadores ISSRs

Número	Iniciador	Secuencia
1	HVH (TG)7T	HVHTGTGTGTGTGTGTGT
2	WHVG (TG) 7	WHVGTGTGTGTGTGTGTG
3	BDB (TCC) 5	BDBTCTCTCTCTCTCTCC
4	DBDA (CA) 7	DBDACACACACACACACA
5	IIVII(TCC)5	IIVIITCCTCTCTCTCTCC
6	HVH(CA)7T	HVHCACACACACACACAT
7	BDB(CA)7C	BDBCACACACACACACAC
8	(CA) 8RG	CACACACACACACACARG
9	(CA)8RY	CACACACACACACACARY
10	(AG)8YA	AGAGAGAGAGAGAGAGAYA
11	(CA)8RT	CACACACACACACACART
12	(CA)8YT	CACACACACACACACAYT
13	(GA)8YC	GAGAGAGAGAGAGAGAYC
14	(AG)8YT	AGAGAGAGAGAGAGAGYT
15	(AG)8YC	AGAGAGAGAGAGAGAGYC
16	(AG)8YG	AGAGAGAGAGAGAGAGYG
17	(AC)8YT	ACACACACACACACACYT
18	(AC)8YA	ACACACACACACACACYA
19	(AC)8YG	ACACACACACACACACYG
20	(GT)8YC	GTGTGTGTGTGTGTGTYC
21	(GT)8YG	GTGTGTGTGTGTGTGTYG
22	(CT)8RC	CTCTCTCTCTCTCTCTRC
23	(CT)8RG	CTCTCTCTCTCTCTCTRG
24	(GT)8YA	GTGTGTGTGTGTGTGTYA
25	(GT)8YC	GTGTGTGTGTGTGTGTYC
26	(GT)8YG	GTGTGTGTGTGTGTGTYG
27	(AG)8RA	AGAGAGAGAGAGAGAGRA
28	DBD(AC)7	DBDACACACACACACAC
29	(TCC)5RY	TCCTCTCTCTCTCTCRY
30	(AG)8C	AGAGAGAGAGAGAGAGC
31	(AG)8G	AGAGAGAGAGAGAGAGG
32	(CA)8A	CACACACACACACACAA

33	(GA)8A	GAGAGAGAGAGAGAGAA
34	(GA)8C	GAGAGAGAGAGAGAGAC
35	(AG)8C	AGAGAGAGAGAGAGAGC
36	(AG)8T	AGAGAGAGAGAGAGAGT
37	(GACA)3RG	GACAGACAGACARG
38	(GACAC)2	GACACGACAC
39	(GAGA)4YG	GAGAGAGAGAGAGAYG
40	(CACAC)4RG	CACACACACACACARG
41	(GATA)4RG	GATAGATAGATAGATARG

Cuadro 4A. Significado de cada letra que forma parte de un iniciador

BASE	SIGNIFICADO	COMPLEMENTO
A	A	T
C	C	G
G	G	C
T / U	T	A
M	A, C	K
R	A, G	Y
W	A, T	W
S	C, G	S
Y	C, T	R
K	G, T	M
V	A, G, C	B
H	A, C, T	D
D	A, G, T	H
B	C, G, T	V
X / N	A, C, G, T	X