



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS

AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN HABAS (*Vicia faba* L.)
COLECTADAS EN EL VALLE TOLUCA-ATLACOMULCO, MÉXICO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA:

MARÍA ELENA SALAZAR LAURELES

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Diciembre de 2014.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN HABAS (*Vicia faba* L.)
COLECTADAS EN EL VALLE TOLUCA-ATLACOMULCO, MÉXICO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA:

MARÍA ELENA SALAZAR LAURELES

COMITÉ DE TUTORES:

Dra. Delfina de Jesús Pérez López. Tutor Académico

Dr. Andrés González Huerta. Tutor Adjunto

Dr. Luis Miguel Vázquez García. Tutor Adjunto

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Diciembre de 2014.

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN HABAS (*Vicia faba* L.)
COLECTADAS EN EL VALLE TOLUCA-ATLACOMULCO, MÉXICO**

Esta tesis fue realizada por la M. en C. María Elena Salazar Laureles, bajo la dirección del Comité Tutorial que se indica y ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
Y RECURSOS NATURALES**

COMITÉ TUTORIAL

TUTOR ACADÉMICO:

DRA. DELFINA DE JESÚS PÉREZ LÓPEZ

TUTOR ADJUNTO:

DR. ANDRÉS GONZÁLEZ HUERTA

TUTOR ADJUNTO:

DR. LUIS MIGUEL VÁZQUEZ GARCÍA

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México, Diciembre del 2014.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su valioso apoyo a través del otorgamiento de la beca económica para la realización de los estudios de doctorado y la beca de Movilidad para Estudios Avanzados a efecto de realizar una estancia en la Universidad Autónoma Chapingo.

A la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) por el apoyo a través de las becas de escolaridad otorgadas durante todos los semestres del programa doctoral.

Al consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) por el apoyo con el otorgamiento de la Beca Tesis de Posgrado para culminar los trámites de titulación correspondientes.

A la Dra. Delfina de Jesús Pérez López, por depositar su confianza en mí, dirigir el trabajo de investigación y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Andrés González Huerta, por su confianza, apoyo y amistad, realmente lo valoro.

Al Dr. Luis Miguel Vázquez García, porque siempre confió en mí, me escuchó, me apoyó, me ayudó y me permitió conocer el gran ser humano que es, gracias por todo, le tengo en muy alta estima y respeto.

Al Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez, por las facilidades otorgadas para realización de los análisis moleculares en el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

Al M. en C. Ricardo Gaspar Hernández por su valiosa experiencia y apoyo aportados durante el trabajo de laboratorio en el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

Al Lic. en Geog. Benjamín Sanabria García por el apoyo técnico en la edición de las gráficas, figuras y mapas que aparecen en el presente trabajo.

DEDICATORIAS

A **DIOS**, mi padre, el más grande en sabiduría y conocimiento... todo lo que soy es por su amor

A mis hijas *Sunny, Ivana* y *Sakura*, mi más bello tesoro, gracias hijas por amarme y apoyarme tanto en éste proyecto.....las amo!

A Benjamín por todos los momentos bellos e inolvidables

A mis padres, *Martín* y *Esperanza*, por su amor y valioso apoyo moral, gran parte de lo que soy es y será siempre gracias a Ustedes, los amo!

A mis hermanos, Flor, Guille, Jorge, Bernardo, Faus y Luis, por su apoyo, confianza y amor; ya que no ha habido necesidad de palabras para aprender tanto de Ustedes, los amo!

A mis suegros, Benjamín y Victoria, valoro mucho su cariño y apoyo, gracias

A mi gran amigo Dr. Carlos M. Arriaga Jordán, excelente universitario, creador del programa del que hoy dignamente egreso y piedra angular en la consolidación del ICAR; gracias por escucharme siempre.

A mi querido tío Roberto L.S., ejemplo familiar de superación, gracias por su cariño y apoyo

A mis entrañables amigos Estela A. R., Lupita T.C, Juanita J.M., Ixchel R.G., Laurita H. B., Verónica L.F., Neri O.C., Roberto G.G., Dr. Antonio L.C. y Mtro. Franco, quienes siempre han creído y confiado en mí, gracias por su valioso apoyo y sincera amistad.

CONTENIDO

| | PÁG |
|--|------|
| LISTA DE TABLAS | vii |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE TABLAS ANEXAS | viii |
| RESUMEN GENERAL | ix |
| ABSTRACT | x |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA | 4 |
| 2.1. Origen geográfico | 4 |
| 2.2. Importancia del cultivo de haba nivel a estatal, nacional e internacional | 4 |
| 2.3. Estudios de variabilidad genética en haba | 6 |
| 2.4. Caracterización mediante marcadores morfológicos | 7 |
| 2.5. Caracterización mediante marcadores moleculares | 10 |
| 2.6. Perspectivas futuras del cultivo de haba | 12 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 13 |
| 3.1. Descripción del área de estudio | 13 |
| 3.2. Material genético | 14 |
| 3.3. Caracterización molecular | 14 |
| 3.3.1. Siembra del material vegetal | 14 |
| 3.3.2. Extracción del ADN | 15 |
| 3.3.2.1. Método de Bromuro de Cetil Trimetil Amonio | 15 |
| 3.3.2.2. Método de Docedil Sulfato de Sodio | 16 |
| 3.3.3. Cuantificación, pureza y calidad del ADN | 17 |
| 3.3.4. Amplificación del ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) | 18 |
| 3.3.5. Revelado de los productos de la amplificación | 19 |
| 3.3.6. Documentación de los productos de la amplificación | 19 |
| 3.3.7. Construcción de la matriz binaria de datos | 19 |
| 3.3.8. Análisis estadístico | 20 |
| 3.4. Caracterización morfológica | 20 |
| 3.4.1. Establecimiento del experimento en campo | 20 |
| 3.4.2. Preparación del terreno | 21 |
| 3.4.3. Registro de las variables a evaluar | 21 |
| 3.4.4. Manejo del experimento | 23 |
| 3.4.5. Cosecha | 23 |
| 3.4.6. Análisis estadístico | 23 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 25 |
| 4.1. Artículo I: Genetic variability analysis of faba bean (<i>Vicia faba</i> L.) accessions using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers | 27 |
| 4.2. Artículo II: Variabilidad fenotípica en colectas de haba provenientes del Valle Toluca-Atlacomulco, México | 50 |
| V. CONCLUSIONES GENERALES | 79 |
| VI. LITERATURA COMPLEMENTARIA | 80 |

LISTA DE TABLAS

| TABLA | | PÁG. |
|---|---|------|
| 1 | Variables a evaluar, código de la variable, tipo de variable y parámetro de registro considerado. | 22 |
| 4.1. Genetic variability analysis of faba bean (<i>Vicia faba</i> L.) accessions using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers | | |
| 1 | Identification code, seed characteristics, gathering place, altitude and geographic coordinates of the 39 assessed accessions. | 44 |
| 2 | Results from amplification and polymorphism of 12 ISSR primers used in this study. | 45 |
| 3 | Genetic distances matrix between the 39 faba bean accessions, based on ISSR data and analyzed with Dice coefficient. | 48 |
| 4.2 Variabilidad fenotípica en colectas de haba provenientes del Valle Toluca-Atlacomulco, México. | | |
| 1 | Código de identificación, características de las semillas, sitios de colecta, altitud y coordenadas geográficas de las 39 accesiones evaluadas. | 69 |
| 2 | Cuadrados medios y significancia estadística de los valores de F de las variables de estudio. | 70 |
| 3 | Comparación de medias para las variables Número de Tallos (NT), Número de Nudos (NN), Número de Foliolos (NFO), Porcentaje de Floración (PF), Número de Flores (NFP), Número de Vainas por Planta (NVP), Peso de Vainas por Planta (PVP), Número de Semillas por Vaina (NSV), Peso de 100 semillas (P100S), Peso de Semillas por Parcela (PSP), Rendimiento por Hectárea (RHA). Población (Pob.). | 71 |
| 4 | Componentes de varianza y heredabilidad en sentido amplio (H^2) en 11 variables cuantitativas evaluadas en 39 cultivares de haba. | 73 |
| 5 | Características de planta y follaje de 39 poblaciones de haba colectadas en el Valle Toluca-Atlacomulco, México. | 74 |
| 6 | Características de flor de 39 poblaciones de haba colectadas en el Valle Toluca-Atlacomulco, México. | 75 |
| 7 | Características de vaina y semilla de 39 poblaciones de haba colectadas en el Valle Toluca-Atlacomulco, México. | 76 |

LISTA DE FIGURAS

| FIGURA | | PÁG. |
|---|--|------|
| 1 | Sitios de colecta de 39 poblaciones de haba en el Valle Toluca-Atlacomulco, México. | 13 |
| 4.1. Genetic variability analysis of faba bean (<i>Vicia faba</i> L.) accessions using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers | | |
| 1 | Electrophoresis in agarose gel at 2 % of 39 faba bean populations, using primer ISSR 848. M: Molecular weights marker; T: non-related species; W: water | 45 |
| 2 | Dendrogram from the UPGMA grouping analysis, using Dice coefficient and ISSR molecular markers in 39 faba bean populations; the number of nodes indicates the percentage obtained with 1000 bootstrapping. | 46 |
| 3 | PCA results of the two first discriminating axes for the 39 faba bean accessions produced by 12 ISSR markers. | 47 |
| 4.2 Variabilidad fenotípica en colectas de haba provenientes del Valle Toluca-Atlacomulco, México. | | |
| 1 | Interrelaciones entre 39 cultivares de haba (en número) y 11 variables agronómicas (en letra). | 77 |
| 2 | Agrupación de 39 cultivares de haba con base en 11 variables agronómicas. Método de agrupamiento de pares no ponderados con medias aritméticas (Método UPGMA). | 78 |

LISTA DE TABLAS ANEXAS

| TABLA | | PÁG. |
|-------|---|------|
| 1 | Lecturas de Absorbancia para calcular la concentración de ADN | 83 |
| 2 | Componentes y concentraciones para preparar de 25 µL de mezcla de reacción. | 84 |

RESUMEN GENERAL

El cultivo de haba (*Vicia faba* L.) en México ha cobrado importancia en los últimos años debido a su alto contenido de proteína ya que ha superado en el mercado los precios del maíz y el frijol, convirtiéndose en un cultivo alternativo con potencial. El objetivo de la presente investigación fue analizar la diversidad genética de 35 poblaciones y cuatro variedades de haba colectadas en el Valle Toluca-Atlaconulco, México; mediante el uso de marcadores moleculares y morfológicos. Para el análisis molecular se utilizaron Inter Secuencias Simples Repetidas; con los datos obtenidos se construyó una matriz binaria misma que fue analizada para generar una matriz de distancias genéticas de acuerdo al Método Aritmético de Pares de Grupos no Ponderados (UPGMA), además fue construido un dendograma con 1000 replicas para hacer los análisis estadísticos correspondientes; mientras que para el análisis morfológico se estableció un experimento en campo de bloques completos al azar y se evaluaron 29 variables, las variables cuantitativas fueron evaluadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) y un análisis de componentes principales. Los resultados del análisis molecular mostraron la presencia de 134 bandas polimórficas, mientras que las distancias genéticas oscilaron de 0.38 a 0.83, lo cual indica alta variabilidad a nivel de DNA. Las accesiones P25 y P29 fueron genéticamente diferentes al resto de poblaciones. Los resultados morfológicos permitieron corroborar que la expresión fenotípica de P29 también fue diferente. Además fue posible identificar poblaciones de interés como: P1, P2, P3, P4, P5, P7, P8, P9, P20, P27, P29, P30, P32 y P36, en cuanto a caracteres como precocidad, periodo de floración y arquitectura del tallo; así mismo, se observó variabilidad en caracteres asociados al rendimiento como número de vainas, número de semillas por vaina y peso de semillas por vaina. La diversidad detectada a nivel molecular y morfológico en las accesiones evaluadas puede ser utilizada en programas de mejoramiento genético, encaminados a resolver problemas específicos de los productores.

ABSTRACT

In Mexico, the cultivation of faba bean (*Vicia faba* L.) has grown in importance in recent years due to its high content of protein; as it has surpassed the prices of maize and bean in the market, it has become an alternative crop with potential. The objective of the present research was to analyze the genetic diversity of 35 populations and four varieties of faba bean, collected in the Valley of Toluca-Atlacomulco, Mexico, by means of molecular and morphological markers. For the molecular analysis Inter Simple Sequence Repeats were used, with the obtained data a binary matrix was build, which was analyzed in order to generate a matrix of genetic distances according to UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Additionally, a 1000-replica dendrogram was constructed to run the corresponding statistical analysis. While for the morphological analysis an in-field experiment was set with full bocks at random and 23 variables were analyzed; quantitative variables were assessed by means of a variance analysis (ANOVA) and a principal component analysis. Results from the molecular the analysis showed the presence of 134 polymorphic bands, while genetic distances oscillated from 0.38 to 0.83, which indicates high variability at DNA level. Accessions P25 and P29 were genetically different from the rest of populations. The morphological results allowed corroborating that phenotypic expression P29 was also different. Moreover, it was possible to identify populations of interest: such as P1, P2, P3, P4, P5, P7, P8, P9, P20, P27, P29, P30, P32 and P36, as for characters such as precocity, flowering period and stem architecture; likewise, variability was observed in characters associated to performance such as number of pods, number of seeds per pod and weight of seeds per pod. The diversity detected at molecular and morphologic level in the assessed accessions can be utilized in genetic improvement programs aimed at solving producer-specific problems.

I. INTRODUCCIÓN

El haba es un cultivo alternativo en los Valles Altos del Centro México, donde casi el 90 % de la superficie se siembra en condiciones de temporal. Esta especie tolera bajas temperaturas y la mayor producción se destina al autoconsumo, predominando ampliamente su asociación con cultivos como maíz y frijol; por su habilidad para fijar nitrógeno atmosférico y aún por crecer en zonas marginales (Pérez y González, 2003; Kalia y Sood, 2004).

El Estado de México es la principal entidad productora de haba del país; se siembran aproximadamente 236 hectáreas (ha) de haba para grano y 5463.70 ha para la producción en verde, las cuales se establecen en condiciones de riego y temporal, con rendimientos promedio de entre 2.15 y 6.99 t ha⁻¹, respectivamente (SIAP 2009). En los últimos años se ha cotizado hasta en 60 pesos el kilo de haba en seco, siendo un cultivo promisorio para los productores.

A pesar de la importancia que tiene esta leguminosa en los Valles Altos del Centro de México, su uso potencial se ha restringido, principalmente por la susceptibilidad a enfermedades y por la carencia de información sobre la diversidad y variabilidad genética, así como por el desconocimiento del adecuado y eficiente manejo de los componentes esenciales de los sistemas de producción, tanto extensivos como intensivos. (Ortiz *et al.*, 1983).

La diversidad genética disponible en México no ha sido totalmente documentada y utilizada. Sin embargo, estudios morfológicos han permitido identificar variabilidad entre y dentro de poblaciones (Lawes *et al.*, 1983), misma que debe ser confirmada a nivel molecular a fin de identificar certeramente la variación genética entre y dentro de accesiones, a efecto de poder incorporar estos materiales en programas de mejoramiento genético, de ahí la importancia del presente estudio.

Por lo que se planteó la siguiente:

HIPÓTESIS

Existe variabilidad genética en las 39 poblaciones de haba evaluadas, y es posible determinarla mediante el uso de marcadores moleculares y morfológicos.

Y los siguientes:

OBJETIVO GENERAL

Analizar la variabilidad genética existente en 39 accesiones de haba del Valle Toluca-Atacomulco mediante marcadores moleculares y morfológicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar molecular y morfológicamente 39 genotipos de haba.
- Evaluar la eficiencia de los marcadores moleculares contra los marcadores morfológicos.
- Utilizar los marcadores moleculares y morfológicos para detectar genotipos sobresalientes y recomendarlos para su incorporación en programas de mejoramiento genético.

Finalmente, considerando que el Estado de México es uno de los principales productores de haba a nivel nacional y tomando en cuenta el potencial económico e industrial que ha alcanzado en la última década, discurrimos en que es un excelente cultivo alternativo para los productores mexiquenses ya que los cultivos básicos tradicionales como el maíz y el frijol son

cada vez menos rentables, y producirlos ya no representa una fuente importante de ingresos, por lo que es necesario canalizar la producción hacia cultivos que le permitan al productor obtener mayores ganancias, tal es el caso del cultivo de haba.

Sin embargo, se ha observado que la producción de haba a nivel mundial, nacional y estatal ha disminuido, debido principalmente a condiciones de estrés biótico y abiótico; por lo que resulta necesario e importante, detectar la variación genética con la que se cuenta en el Estado de México. Actualmente el uso de herramientas moleculares como los marcadores genéticos permiten hacer con mayor precisión y eficiencia ésta detección, esto aunado a tecnologías modernas de mejora de plantas sirve para identificar a las poblaciones de haba de interés agronómico que puedan ser incorporadas en programas de mejoramiento genético que respondan de manera específica a incrementar la producción, tolerar o resistir el ataque de plagas y enfermedades, tolerar condiciones deficientes de suelo, entre otros, Con ello se coadyuva a beneficiar a los productores mexiquenses y mexicanos que se dedican a la producción de éste cultivo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen geográfico

Vicia faba L. fue una de las primeras leguminosas domesticadas por el hombre, tiene su origen en la región mediterránea y en el suroeste de Asia, aunque se extendió rápidamente a Europa, el Norte de África, Etiopía a lo largo del Nilo, India, China y México. Cubero (1974) menciona como centro de origen el cercano Oriente, desde donde se extendió al Mediterráneo y posteriormente al resto del mundo. Esta especie fue introducida a México con la llegada de los españoles, hace casi 600 años. Actualmente se cultiva ampliamente en regiones templadas y subtropicales (Flores *et al.*, 2012).

2.2. Importancia del cultivo de haba a nivel estatal, nacional e internacional

El Estado de México ocupa el primer lugar en producción de vaina verde y el cuarto sitio de haba en seco con rendimientos promedio de 6.3 tha^{-1} y 1.48 t ha^{-1} , respectivamente (FAOSTAT, 2013). En los Distritos de Desarrollo Rural (DDR) de Toluca y Atlacomulco cuyas altitudes fluctúan entre 2600 y 2800 msnm, se reportan rendimientos de 12 a 15 ton/ha con las variedades Tlaltizapán e Icamex; y representan el 27.7 % del total de la superficie estatal destinada a éste cultivo. En el DDR Valle de Bravo se reportan rendimientos superiores a 15 ton/ha. Los principales municipios productores de los DDR de Atlacomulco y Toluca que abarcan el Valle Toluca-Atlacomulco son: San Felipe del progreso, Acambay, Temascalcingo, Ixtlahuaca, Almoloya de Juárez, Lerma, Toluca y Zinacantepec; además de Jilotepec, Tejupilco y otros municipios del sur y el oriente de la entidad. (INIFAP, 2013). Aún cuando el Estado de México no ocupa el primer lugar en rendimiento a nivel nacional si se puede

trabajar para lograrlo. En cuanto a precio en el mercado nacional de haba en seco si ocupa el primer lugar.

A nivel nacional el consumo *per cápita* de haba es de un kilogramo. La región de los Valles Altos de la Mesa Central que comprenden las principales entidades productoras son: Puebla, México, Tlaxcala, Michoacán, Hidalgo y Guanajuato, las zonas altas de Veracruz y Chiapas, y en menor escala Baja California, Sinaloa y Durango (FAOSTAT, 2013). La habilidad del cultivo para adaptarse a un amplio rango de condiciones agro ecológicas asegura una mayor diversidad.

A nivel global, China, Etiopía, Egipto, Marruecos, Italia y Perú son los principales países productores, el haba es la leguminosa que ocupa el séptimo lugar en importancia económica (Crepón *et al.*, 2010), registrándose una producción mundial de 4.3 millones de toneladas. Tradicionalmente en Europa su uso es con fines de alimentación humana y para ganado, en países subdesarrollados de África y Asia, representa una fuente barata de proteína y en América solo algunos países la producen como Perú, Argentina, Bolivia, Colombia y México (FAOSTAT, 2013). No obstante, por la amplia gama de usos que se le atribuyen actualmente, su potencial industrial ha aumentado y esto le permite ubicarse como un cultivo alternativo y promisorio para los productores.

Sin embargo, en casi todas las latitudes donde se le cultiva se enfrentan serios problemas de ataque de plagas y enfermedades lo que ha limitado considerablemente el rendimiento.

2.3. Estudios de variabilidad genética en haba

La colección, caracterización, conservación y utilización de los recursos fitogenéticos es de gran importancia. Tales recursos durante mucho tiempo han estado sometidos a una intensa presión de selección natural e inducida, esto aunado a la deriva génica, ha dado origen a un gran número de genotipos, ampliando con ello la diversidad y variabilidad genética.

Sin embargo, dicha diversidad está reduciéndose por diversos factores como las exigencias en el mercado, el desplazamiento de las variedades criollas por cultivares foráneos, el abuso de sustancias químicas y la destrucción de los ecosistemas que han conducido a la erosión genética, entre otros (Duc *et al.*, 2010). Los estudios sobre variabilidad genética aplicados a los bancos de genes son una de las herramientas que ayudan a tener un control más efectivo sobre la erosión genética.

Además, permiten seleccionar individuos que por sus características promisorias o por su tolerancia o resistencia a condiciones bióticas o abióticas, faciliten la incorporación de genes y el establecimiento de la mejor estrategia reproductiva en programas de mejoramiento genético. La importancia del mantenimiento de estos recursos está en la medición y caracterización de dicha diversidad o variabilidad genética (Alghamdi *et al.*, 2012a).

Para ello se utilizan descriptores o características cuya expresión sea fácil de medir, registrar o evaluar, y hace referencia a la forma, estructura o comportamiento de las especies. Los descriptores son aplicados en la caracterización y evaluación de accesiones debido a que ayudan a su diferenciación (Franco e Hidalgo, 2003). Para estudios de variabilidad los genotipos deben ser descritos agrónomicamente, morfológicamente y genéticamente, con la finalidad de

observar los rasgos característicos de la especie y de diferenciar aquellos que varían entre y dentro de las especies (Madriz y Luciani, 2002). La caracterización molecular de manera específica permitirá descubrir genes y alelos de interés para los mejoradores (Duc *et al.*, 2010).

2.4. Caracterización mediante marcadores morfológicos

El haba es una especie parcialmente alógma, lo que hace más caro y difícil el mantenimiento y estabilidad de los genotipos mejorados (Duc *et al.*, 2010 y Pearce *et al.*, 2000) por ello, los materiales criollos que a través del tiempo han fijado genes de interés, representan una importante fuente de germoplasma para presentes y futuros programas de mejoramiento genético (Yahia *et al.*, 2012).

El estudio de la variabilidad genética basada en los rasgos morfológicos y agronómicos es una herramienta básica e importante para una explotación efectiva en los esquemas de mejoramiento genético de plantas, en la conservación eficiente del germoplasma y en el manejo agronómico (Pearce *et al.*, 2000). En el caso del haba, desde hace dos décadas, en Europa y Siria se han hecho grandes inversiones económicas destinadas a la investigación para descubrir la variabilidad genética y los caracteres de interés agronómico. En Alemania y Francia, se ha encontrado amplia diversidad en días a floración, precocidad, hábito de crecimiento, arquitectura del tallo, longitud de entrenudos, ramas, tipo de crecimiento, rigidez del tallo (Arbaoui *et al.*, 2008); en Siria se ha registrado amplia variación fenotípica en la pigmentación del tallo, tamaño y forma de los foliolos, color de la mancha de melanina en el ala y el estandarte, ángulo, forma, superficie, color y distribución de las vainas, color de la

semilla, de la testa y color del hiliium (Robertson and El-Sherbeeney, 1991); mientras que en Etiopía se ha observado variabilidad en el tamaño de las hojas y en la posición y color de las vainas. A su vez en China Li-juan *et al.*, (1993) al analizar mil 500 accesiones de diferentes provincias detectaron diferencias en el tamaño de la vaina, número de semillas por vaina y color de la semilla, de acuerdo a dos grupos bien definidos, los cultivares de invierno y de primavera. En México, también se han observado diferencias en el tamaño y color de la semilla, días a floración, ciclo vegetativo, altura y rendimiento (Pérez y González, 2003). Dicha variación está determinada por la adaptación del germoplasma a las condiciones agroecológicas, el origen de los materiales, la fecha de siembra, la altitud, la tolerancia a estrés biótico y abiótico, y al manejo agronómico.

A nivel global se identifican cuatro variedades botánicas: *Vicia faba paucijuga*, *Vicia faba mayor*, *Vicia faba equina* y *Vicia faba minor*; tales distinciones están basadas sobre las diferencias en peso, forma y tamaño de la semilla (Cubero, 1974; Nadal *et al.*, 2004). En México Díaz-Ruíz *et al.*, (2006), comentan que hasta el momento solo se han identificado dos grupos botánicos, mayor y equina y que se han diferenciado por los diferentes colores de la semilla en seco como son amarilla, blanca o cimarrona, moteada o parraleña y roja o morada.

Lo anterior implica que las poblaciones nativas o criollas son una mezcla de estos dos grupos botánicos que poseen genes diferentes y que se adaptan a las condiciones ambientales donde crecen. Motivo por el cual los estudios de caracterización morfológica cobran importancia.

Orozco *et al.*, (2013), evaluaron 36 poblaciones de haba en tres localidades del estado de México, ellos encontraron diferencias altamente significativas para los ambientes, las poblaciones y su interacción en 11 de las 12 variables evaluadas, lo que indicó variabilidad en el comportamiento de los genotipos evaluados.

Terzopoulos *et al.*, (2004), comentan que la caracterización y evaluación de accesiones criollas es importante para su uso en programas de mejoramiento. Ellos evaluaron 55 accesiones de haba de Grecia durante dos años consecutivos, basados en rasgos morfológicos y agronómicos, y encontraron similitud con accesiones Europeas, debido a que los tipos *minor* y *major* también crecen en Europa; En cinco poblaciones se detectaron características propias del tipo *minor*, tales como distribución uniforme de las vainas en el tallo, ángulo erecto a la maduración y forma sub elíptica de la vaina.

Terzopoulos *et al.*, (2008), encontraron mayor diversidad fenotípica en rasgos morfológicos dentro de las poblaciones que evaluaron, los caracteres que les permitieron detectar diferencias fueron longitud de vaina, número de flores, vainas por nudo, grosor del tallo y flores por inflorescencia por vaina por nudo; por lo que sugieren hacer un análisis profundo de la estructura génica de esos cultivares.

Yahia *et al.*, (2012), analizaron 42 cultivares criollos de haba provenientes de ocho localidades del sur de Túnez, utilizaron 35 descriptores morfológicos; ellos observaron diferencias significativas entre los cultivares para todos los descriptores utilizados. Según el análisis multivariado se formaron ocho grupos y dentro de ellos se observaron diferencias importantes,

que al parecer no estuvieron determinadas por su origen de colecta, sin embargo, atribuyen las diferencias fenotípicas encontradas al origen genético de los materiales que es el Mediterráneo donde predominan los tipos *equina*, *minor* y *major*.

Por su parte, Mohammed *et al.*, (2010) utilizaron 11 descriptores agronómicos y morfológicos para evaluar accesiones de haba durante dos ciclos de cultivo e identificar a los mejores materiales según su rendimiento, encontrando diferencias altamente significativas en los descriptores utilizados según el ciclo de cultivo. Tales resultados indicaron que en lugares con inviernos cortos la época de siembra es determinante para favorecer al cultivo.

2.5. Caracterización mediante marcadores moleculares

En los últimos años, el empleo de herramientas biotecnológicas como los marcadores moleculares, ha permitido complementar la información obtenida con caracteres morfológicos. A través de su uso es posible estimar la diversidad genética de manera más confiable; ya que se consideran características determinadas por un número pequeño de genes de alta heredabilidad y además se tiene un control eficiente de la interacción genotipo-ambiente.

Existen diferentes tipos de marcadores moleculares, Zeid *et al.*, 2003 usaron los de polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP, por sus siglas en inglés) de ADN en cultivares de haba provenientes de Asia, Europa y África del norte y detectaron una amplia diversidad genética, adicionalmente, determinaron las interrelaciones entre progenitores y la heterosis en sus progenies.

Así mismo Yujiao y Wanwei, 2010; también utilizaron AFLP para analizar la diversidad genética de dos bancos de germoplasma de haba y encontraron que la estructura genética de uno de ellos se dividió en siete grupos, lo que permitió conocer que de las 149 poblaciones analizadas, 40 de éstas representaron más del 80 % de la información genética del cultivo de haba de la región que evaluaron, material que podría usarse con fines de mejoramiento genético,

GongYa-ming *et al.*, 2010 y 2011, usaron 11 marcadores de secuencias simples repetidas con registro de la expresión de secuencias etiquetadas (EST-SSR), para evaluar la diversidad genética de cultivares de China y Europa; los resultados indicaron que las habas de China tienen una línea genética base y que además las fuentes adicionales de accesiones genéticas podrían incrementar la variabilidad de la especie.

En un estudio de la diversidad y relaciones genéticas entre 802 variedades criollas y mejoradas de diferentes zonas geográficas de China, usando marcadores de ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) con 11 cebadores encontraron un total de 212 bandas de las cuales 209 fueron polimórficas. Esto permitió conocer que hay una mayor diversidad genética en los cultivares del norte de China con respecto a los del centro, separándose claramente en dos grupos, los de invierno y los de primavera, según el análisis de componentes principales y el analizador de grupos UPGMA. Además los dendogramas fueron comparados con cultivares de germoplasma de haba de otras partes del mundo y se encontró que para ésta especie China representa un grupo geográfico a nivel de continentes, teniendo más cercanía genética con las variedades de Europa que con las del norte de África (Wang *et al.*, 2012).

Abdel-Razzak *et al.*, 2012, analizaron la variabilidad genética de 10 variedades de haba en dos lugares geográficamente diferentes de Egipto, ellos utilizaron marcadores ISSR y nueve iniciadores, detectando un 69.1 % de polimorfismo, lo que representa un relativo alto nivel de polimorfismo, esto permitió distinguir dos grupos característicos, uno para los cultivares de *V. faba* var. *major* y otro para *V. faba* var. *minor*. Porcentajes mayores de polimorfismo encontraron Terzopoulos y Bebeli (2008).

2.6. Perspectivas futuras del cultivo de haba

El haba posee uno de los genomas más grandes entre las plantas cultivadas, pero también uno de los menos estudiados, ya que en la actualidad son pocos los mapas genéticos reportados relacionados con ésta especie (Ellwood *et al.*, 2008). Los mapas de ligamiento que existen están basados en análisis morfológicos, de isoenzimas, marcadores RAPDS, RFLP y microsatélites; por tal motivo el uso de nuevos marcadores, acompañados de mapeos cuantitativos como los de *locus* de rasgos cuantitativos (QTL, por sus siglas en inglés) serán cruciales para la construcción de mapas genéticos que provean información eficiente que pueda ser utilizada en estudios genéticos y de mejoramiento que permitan el uso de marcadores de selección asistida para caracteres de interés agronómico (Alghamdi, 2012a).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Descripción del área de estudio

El Valle Toluca-Atlacomulco, Estado de México; ubicado en la Mesa central de México, fue considerado como zona de colecta de las poblaciones evaluadas. La coleta se realizó en 12 municipios, mismos que se indican en la Figura 1.

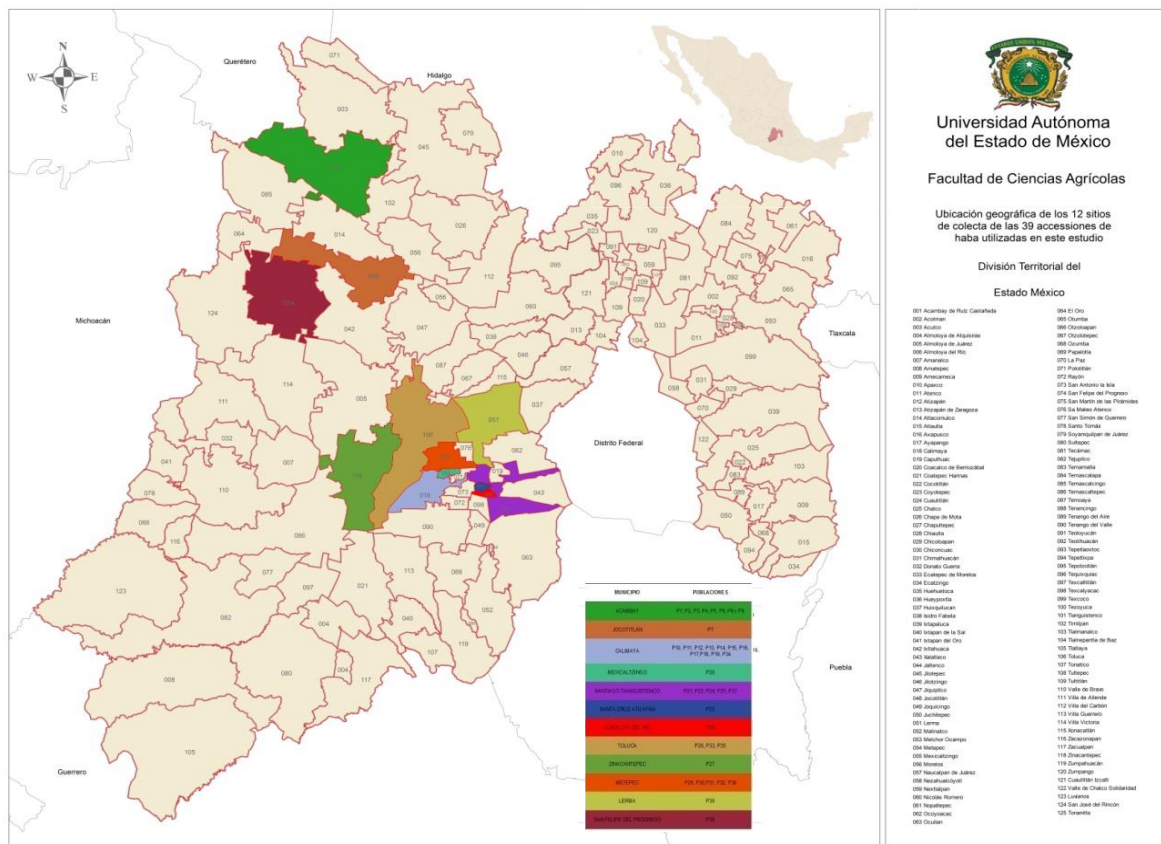


Figura 1. Sitios de colecta de 39 poblaciones de haba en el Valle Toluca-Atlacomulco, México.

3.2. Material genético

Un total de 39 accesiones fueron consideradas para ser evaluadas en el presente estudio, 35 fueron colectas directas con los productores y cuatro fueron variedades generadas por el Instituto de Capacitación Agrícola, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX). En el cuadro 1 se muestran algunas características de las poblaciones consideradas.

3.3. Caracterización molecular

El estudio de la variabilidad genética se realizó mediante el análisis de huellas genéticas, se procedió como se describe a continuación:

3.3.1. Siembra del material vegetal

Para la germinación de las semillas se utilizaron charolas de 200 cavidades, mismas que fueron lavadas con agua corriente y jabón, luego se enjuagaron y finalmente se desinfectaron durante 10 minutos (min) con un antiséptico comercial. El sustrato para el llenado de las charolas consistió de una mezcla de *Peat moss* y Agrolita en proporción 2:1, previamente humedecida.

Las semillas de las 39 poblaciones fueron desinfectadas con el fungicida comercial Manzate, para ello se mojaron y luego se impregnaron de éste. Posteriormente se sembraron en las charolas, depositando una semilla por pozo, considerando sembrando 10 plantas por accesión, una vez sembradas se regaron ligeramente y se colocaron en un invernadero con temperatura y humedad relativa controladas. Después se dieron riegos ligeros mañana y tarde hasta la germinación, que ocurrió 15 días después de la siembra.

3.3.2. Extracción del ADN

De las plantas germinadas se cortaron al azar aproximadamente dos gramos (g) de hojas jóvenes, sanas y sin daño físico o mecánico de cada una de las accesiones, el corte se realizó con un bisturí estéril, previo rociado de las plantas con etanol, para evitar posible contaminación del material. Las muestras fueron llevadas al laboratorio, se procesaron por duplicado por cada accesión. Para asegurar la extracción de ADN integro, se probaron cuatro métodos de extracción, que son los siguientes:

3.3.2.1. Método de Bromuro de Cetil Trimetil Amonio

Cada una de las muestras de las 39 poblaciones se procesaron de la siguiente manera: en una báscula Adventurer OHAUS fueron pesados 300 mg de tejido y se colocaron en un mortero estéril y frío, al cual le fue agregado nitrógeno líquido para favorecer la molienda, ésta se hizo con el pistilo. Luego éste macerado se colocó con una espátula estéril en un tubo Eppendorf que contenía un volumen de 750 μ L de amortiguador de extracción de Bromuro de Cetil Trimetil Amonio (CTAB, por sus siglas en inglés) (Doyle y Doyle, 1990). En esta condición permanecieron en incubación a 60 °C durante 20 min. Posteriormente, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 5 min para luego centrifugarlas 10 min a 12 000 gravedades (xg) en una centrífuga SURVALL, Thermo Electron. Finalizada la centrifugación se recuperó el sobrenadante y se le agregó un volumen de 600 μ L cloroformo: alcohol isoamílico en proporción 24:1 y se mezcló durante 2 min por inversión. Luego se centrifugaron 10 min a 12 000 xg y al término se recuperó la fase acuosa de cada muestra y se les agregaron 3 μ L de ARNasa y se dejaron 25 min a temperatura ambiente, al término se

agregaron 70 μL de acetato de sodio 3M y 600 μL de isopropanol frio, se agitaron por inversión hasta obtener el precipitado de ADN y se dejaron precipitar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min, posteriormente se centrifugaron 10 min a 12 000 xg y al final se eliminó el sobrenadante, cuidando de no perder el ADN contenido en la pastilla que quedó en los tubos Eppendorf, a los cuales se les agregaron 500 μL de etanol al 70 % grado reactivo agitándose suavemente para disolver las sales, finalmente se centrifugaron a 8 000 xg durante 10 min, se decantaron las muestras, se dejaron escurrir en una toalla sanitaria, se secaron y se disolvieron en 500 μL de solución para disolver (TRIS y EDTA, TE), en ésta condición se almacenaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su uso posterior.

3.3.2.2. Método de Docedil Sulfato de Sodio

Consistió en moler 200 mg de cada una de las muestras con nitrógeno líquido y colocarlas en tubos Eppendorf que contenían 800 μL de amortiguador de extracción Docedil Sulfato de Sodio (SDS, por sus siglas en inglés)(Dellaporta, 1983), luego las muestras se incubaron a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min y luego se centrifugaron a 12 000 xg durante 10 min, para posteriormente transferir los sobrenadantes a otros tubos y adicionarles ARNasa a concentración de 10 mgmL^{-1} e incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min. Luego se les adicionó un volumen de 800 μL de cloroformo: alcohol isoamílico en proporción 24:1 y se mezclaron por inversión. Después se centrifugaron a 13 000 xg durante 15 min a 4°C y se transfirieron los sobrenadantes a otros tubos Eppendorf y les fue adicionado 500 μL de isopropanol y se mezclaron por inversión, luego se dejaron durante una hora a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para después centrifugar a 12 000 xg por 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente las pastillas se resuspendieron en 400 μL de TrisHCl pH 8 10 mM, EDTA 1

mM (TE) y se incubaron a 65 °C durante 15 min, después de centrifugaron a 12 000 xg por 5 min los sobrenadantes se transfirieron a otros tubos y se les adicionó un décimo de volumen (40 µL) de acetato de sodio y dos tercios de volumen (270 µL) de isopropanol frio, se mezclaron y se dejaron precipitar durante dos horas a 4 °C. Luego se centrifugaron a 12 000 xg por 10 min a 4 °C y al final se eliminaron los sobrenadantes, las pastillas de ADN se lavaron con 800 µL de etanol (grado reactivo) al 80 % y se centrifugaron a 12 000 xg por 10 min, se eliminó el sobrenadante, se secaron las pastillas colocando los tubos Eppendorf abiertos con la tapa hacia abajo y se disolvieron en 100 µL de TE. Así se guardaron en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Los otros dos métodos de extracción fueron modificaciones hechas al buffer de extracción del método de Dellaporta (1983), con la finalidad de evitar la oxidación causada por el exceso de taninos en las muestras. La primera modificación consistió en adicionarle 0.5 mM de ácido ascórbico y 1 % de metabisulfito de sodio(Stewart y Via, 1993) y la segunda solo adicionarle 0.5 mM de ácido ascórbico, según Hoelzel (1992).El resto de protocolo fue el mismo.

Finalmente el método utilizado correspondió a Dellaporta (1983) con las modificaciones de Hoelzel, (1992).

3.3.3. Cuantificación, pureza y calidad del ADN

Para probar que el ADN estaba presente e integro, después de todo el proceso de extracción, se corrió una electroforesis en gel de agarosa, antes de hacer la cuantificación y estandarizar la cantidad a utilizar para las amplificaciones finales. Para ello se preparó agarosa ultrapura Invitrogen al 0.8 por ciento en 100 mL de agua destilada estéril, se montó la cámara de

electroforesis C,B.S. Scientific y se cargaron 10 μL de ADN y 2 μL de colorante de carga en cada pozo de cada una de las muestras. La cámara se conectó a una fuente de poder Thermo EC 105 y se corrió a 120 Volts, durante dos horas.

Para conocer la cantidad de ADN presente en las muestras, se hicieron lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro Thermo Scientific a longitud de 260 nanómetros (nm). Para ello se midieron 995 μL de agua destilada y se colocaron en un microtubo de 1.5 mL, luego se adicionaron 5 μL de ADN y se mezcló por inversión. Posteriormente con ayuda de una micropipeta de 1.0 mL se transfirió ésta solución a una celda de cuarzo, evitando que no se formaran burbujas y se colocó en el espectrofotómetro para tomar la lectura correspondiente y se registraron los datos. Éste procedimiento se realizó para cada una de las muestras. Con los datos obtenidos se calculó la concentración de ADN mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN } \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}] = A_{260} \times 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \times \text{Factor de dilución} / 1000$$

Una vez determinada la concentración de ADN se hicieron diluciones para obtener concentraciones de 10 nanogramos (ng) por μL , en un volumen de 500 μL de agua (Tabla 1 de los anexos). Las muestras así cuantificadas fueron refrigeradas y utilizadas para la amplificación.

3.3.4. Amplificación del ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se probaron 40 cebadores o iniciadores ISSR del Set de primers de la University British Columbia y el ISSR-2 que no pertenece al Set y fue sintetizado por la empresa SIGMA, S.A. de C.V. Del total de primers utilizados solo 12 amplificaron bandas polimórficas.

Las secuencias de los 12 primers se refieren en la Tabla 2 del Artículo I.

Las amplificaciones se hicieron para cada una de las muestras, utilizando 25 μL de mezcla de reacción preparada como se indica en la Tabla 2 del anexo y se le agregaron 2 μL de colorante de carga, luego se cargaron en los pozos de la cámara de electroforesis que contenía el gel de agarosa al 2 %. Las condiciones de amplificación del termociclador fueron las siguientes: pre apertura 93°C 20 s, desnaturalización 94°C 20 s, alineamiento 40°C 1 min, amplificación o polimerización de 51 a 61 °C 20 s (según el primer a amplificar), estas tres últimas condiciones durante 40 ciclos, finalmente un ciclo adicional a 72°C 6 s para concluir el proceso. El corrimiento se realizó durante 2.5 horas.

3.3.5. Revelado de los productos de la amplificación

El revelado se realizó por inmersión de los geles durante 10 a 15 min en una solución de bromuro de etidio a concentración de 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a partir de una solución concentrada de 10 mg mL^{-1} del reactivo.

3.3.6. Documentación de los productos de la amplificación

Una vez hecha la revelación, los geles fueron documentados en un Transiluminador High Performance UV conectado a una computadora convencional para almacenar la imagen con las bandas registradas.

3.3.7. Construcción de la matriz binaria de datos

Las bandas polimórficas de los 12 primers que amplificaron fueron contabilizadas y

registradas para construir una matriz binaria de datos, considerando como 1 la presencia de la banda y como 0 la ausencia.

3.3.8. Análisis estadístico

La matriz binaria de datos fue analizada con el programa estadístico Free Tree (Versión 0.9.1.5) (Pavlicek *et al.*, 1999) para generar la matriz de distancias genéticas usando el coeficiente DICE, también conocido como índice de similaridad de Nei's y Li (1979). Los resultados de la matriz fueron analizados de acuerdo al UPGMA, así mismo se construyó un dendograma con 1000 replicas bootstrap. Para visualizar el dendograma se utilizó el programa Tree View-Tree. Con los resultados generados se realizó el análisis molecular. La seguridad informativa de los primers para diferenciar entre accesiones fue analizada mediante el Contenido de su Información Polimórfica, Índice del Marcador y el Poder de Resolución (PIC, MI y Rp, respectivamente, por sus siglas en inglés).

Para el análisis molecular también se realizó un análisis de componentes principales obtenido mediante la correlación de la matriz binaria de datos en el programa GenA1Ex 6.501 (Peakall y Smouse, 2006; 2012) e interpretado según sus tres coordenadas principales.

3.4. Caracterización morfológica

3.4.1. Establecimiento del experimento en campo

La siembra se realizó en el ciclo primavera verano de 2013, en el Municipio de San Mateo Atenco, México, perteneciente al DDR I Toluca, en condiciones de temporal y fue establecido como se describe a continuación.

3.4.2. Preparación del terreno

Una superficie de dos mil metros cuadrados fue barbechada con un tractor Massey Ferguson, luego se aplicaron 600 kilogramos de estiércol seco de bovino; y se incorporó mediante un paso de rastra; la nivelación del terreno se hizo con otro paso de rastra, finalmente se realizó el surcado a 0.80 m de distancia entre surcos.

El establecimiento de las 39 poblaciones realizó de acuerdo a un diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones. Considerando parcelas de tres surcos de cuatro metros de largo cada uno. Se sembraron dos semillas por mata a 0.4 metros de distancia entre éstas.

3.4.3. Registro de las variables a evaluar

Se consideraron 29 variables agronómicas y morfológicas de las cuales 18 fueron cualitativas y 11 cuantitativas; según la guía del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS, 2001) para la descripción de caracteres de haba, derivada del Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos y del Centro Internacional de Investigaciones Agrícolas en Zonas Áridas (IBPGR e ICARDA, por sus siglas en inglés, respectivamente). El registro de los datos se realizó considerando 10 plantas por parcela del surco central de cada repetición. En la Tabla 1 se indica la etapa del cultivo y la forma de registro de las variables.

Tabla 1. Variables a evaluar, código de la variable, tipo de variable y parámetro de registro considerado.

| Variable | Código de identificación | Tipo de variable | Parámetro de registro considerado |
|---|--------------------------|--------------------|--|
| Hábito de Crecimiento | HC | Cualitativa | Determinado, Indeterminado |
| Altura de la Planta | AP | Cualitativa | Baja, Media, Alta |
| Número de Tallos | NT | Cuantitativa | Registro del NT por planta |
| Número de Nudos | NN | Cuantitativa | Se contabilizó el número de nudos incluyendo el primer nudo floral |
| Coloración de las Antocianinas del Follaje | CAF | Cualitativa | Presente, Ausente |
| Número de Foliolos | NFo | Número de foliolos | Se consideró el número de foliolos de la hoja compuesta seleccionada |
| Color del Follaje | CF | Cualitativa | Verde, Verde Azulado, Verde Grisáceo |
| Porcentaje de Floración | PF | Cuantitativa | Se contabilizó el número de flores (hasta que el 50 % * 1 de la parcela experimental registró floración) |
| Número de Flores por Planta | NFP | Cuantitativa | Registro del número de flores en el segundo segmento floral por planta |
| Longitud de la Flor | LF | Cualitativa | Pequeña, Mediana, Grande |
| Extensión de la Coloración de las Antocianinas en la Flor | ECAF | Cualitativa | Pequeña, Mediana, Grande |
| Presencia de Mancha de Melanina en el Ala | PMMA | Cualitativa | Presente, Ausente |
| Color de la Mancha de Melanina en el Ala | CMMA | Cualitativa | Café, Negra, Amarilla verdosa |
| Mancha de Melanina en el Estandarte | MME | Cualitativa | Presente, Ausente |
| Coloración de las Antocianinas en el Estandarte | CAE | Cualitativa | Presente, Ausente |
| Porte de Vaina | PV | Cualitativa | Semierecto, Erecto, Horizontal |
| Grado de Curvatura de la Vaina | GCV | Cualitativa | Ausente, Débil, Media |
| Intensidad de Color Verde de la Vaina | ICVV | Cualitativa | Débil, Media, Fuerte |
| Forma de la Semilla | FS | Cualitativa | Oblonga, Elíptica, Ovada |
| Color de la Semilla | CS | Cualitativa | Café claro, Jaspeada |
| Presencia de Hillium | PH | | |
| Número de Vainas por Planta | NVP | Cuantitativa | Se registró el número de vainas por planta |
| Peso de vainas por Planta | PVP | Cuantitativa | Se registró el peso de 10 vainas por planta |
| Número de Semillas por Vaina | NSV | Cuantitativa | Se registró el número de semillas por vaina |
| Peso de 100 Semillas | P100S | Cuantitativa | Se registró el peso de 100 semillas |
| Peso de Semillas por Parcela | PSP | Cuantitativa | Se registró el peso de las semillas por parcela |
| Rendimiento por hectárea | RHA | Cuantitativa | Se transformaron los datos de PSP a RHA, th ⁻¹ |

3.4.4. Manejo del experimento

Después de la siembra se dieron tres riegos de auxilio durante los meses de mayo y junio debido al mal temporal. El control de malezas, se realizó de manera manual durante todo el ciclo del cultivo, así como también la presencia de plagas y enfermedades ya que la incidencia fue mínima, además la intención del control manual fue para observar la tolerancia de los materiales a la presencia de las plagas o patógenos, aún cuando no fue parte de los objetivos de la investigación.

3.4.5. Cosecha

La cosecha fue manual, se realizó a los 210 días de establecido el cultivo, una vez que las vainas estuvieron completamente secas. Cada parcela se cosechó de manera individual.

3.4.6. Análisis estadístico

Se hizo un análisis de varianza y sus cuadrados medios fueron empleados para calcular los componentes de varianza y la heredabilidad en sentido amplio (H^2), este último considerado como un estimador de la variabilidad genética existente entre cultivares (Pérez et al., 2007). La fórmula utilizada fue la siguiente:

$H^2 = VG / VF \times 100$ o bien $H^2 = \sigma^2_G / \sigma^2_F \times 100$, a su vez:

$\sigma^2_G = CMr - CMe / r$

$\sigma^2_F = \sigma^2_G + (\sigma^2_e / r)$,

donde:

CMr = Cuadrados medios de las repeticiones

CMe = Cuadrados medios del error

r = repeticiones

También se realizó una comparación de medias entre cultivares con la prueba de Tukey ($\alpha=0.01$). Las medias aritméticas de cada cultivar para las 11 variables cuantitativas fueron utilizados para obtener una matriz de datos: los cultivares se asignaron a las hileras y los valores de cada variable a las columnas. Con esta matriz se obtuvieron los análisis de componentes principales (ACP; Sánchez, 1995) y de conglomerados (Método de la media aritmética no ponderada, UPGMA Method, por sus siglas en inglés). Ambos análisis se realizaron con el Sistema para Análisis Estadístico (Statistical Analysis System, SAS, 1988); la gráfica del *biplot* se hizo con Microsoft Excel 2010, usando las puntuaciones de los dos primeros componentes principales (Pérez et al., 2007).

IV. RESULTADOS

Y

DISCUSIÓN



Chillán, Chile, November 27, 2014

Mister/Miss

Delfina de Jesus Perez-Lopez

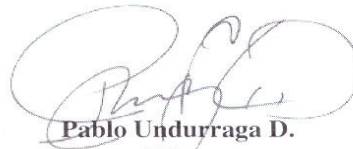
Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado d
Toluca, Mexico
Mexico

Dear author:

We are pleased to inform you that the manuscript **Genetic variability analysis of faba bean (*Vicia faba* L.) accessions using Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers**, of **Maria E. Salazar-Laureles, Delfina de J. Perez-Lopez, Andres Gonzalez-Huerta, Luis M. Vazquez-Garcia, and Ernestina Valadez-Moctezuma**; code **CJAR140417**, has been accepted as a Scientific Note for publication in Chilean Journal of Agricultural Research.

Your manuscript will be published in Volume 75, issue 01, in March 2015

Sincerely yours



Pablo Undurraga D.
Editor

Chilean J. Agricultural Research
pundurra@inia.cl



CHILEAN JOURNAL of AGRICULTURAL RESEARCH
Avda. Yumbay 15, Chillán, Chile
Teléfono: 56 71 2200730

Artículo I:

Genetic variability analysis of faba bean (*Vicia faba* L.) accessions using Inter- Simple Sequence Repeat(ISSR) markers

M. E. Salazar-Laureles¹, D. de J. Pérez-López^{1*}, A. González-Huerta¹, L.M. Vázquez-García², Ernestina Valadez-Moctezuma³

^{1*}Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma del Estado de México, El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, México. México. Phone: (+52) 722 2965518, ext. 148

²Centro Universitario Tenancingo de la Universidad Autónoma del Estado de México, km 1.5 carretera Tenancingo-Villa Guerrero, México, C.P. 52414

³Universidad Autónoma de Chapingo, Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia, km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, México, C.P. 56 230.

ABSTRACT

Faba bean crop is important in Mexico, it is a legume rich in protein and its market price is higher than those of maize and bean; however, in recent years there has been a significant decline in its performance. The aim of this study was to determine the genetic variability and analyze the relationship between 39 faba bean accessions using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. Accessions of faba bean were collected according to their best phenotypic characteristics, later they were molecularly characterized. With the obtained band registration, a binary data matrix was built to perform the corresponding statistical analysis. The utilized ISSR markers produced 142 fixed and repeatable bands, of which 134 were polymorphic. The values of Rp, PIC and MI (Resolution power, Polymorphic Information Content and Marker Index, respectively) indicated that primer 848 was the most efficient to analyze genetic variability with values of 12.8, 0.40, and 8.06, respectively, followed by primers 857 and ISSR2M.

Genetic distances oscillated between 0.38 and 0.83, and verified the groupings observed in the dendrogram, which indicates high variability at the level of DNA among the analyzed genotypes, observing six defined groups according to UPGMA analysis. In the analysis of main components the registered groupings were determined by the origin of the gathering. The use of ISSR markers was efficient to characterize at the level of DNA the assessed bean accessions, indicating the existence of variability, the identified contrasting accessions can be utilized in genetic improvement programs aimed at solving the needs of the producers.

Key words: Genetic variability, Mexico, molecular characterization, *Vicia faba*

Corresponding author: djperezl@uaemex.mx

INTRODUCTION

Cultivation of faba bean is important because its high content of protein, ability to fix atmospheric N and improve soils, among others, is globally recognized and has been profusely documented (Maalouf et al., 2011; Wang et al., 2012). In Mexico, faba bean is cultivated in the High Valleys mainly in the states of Puebla, Mexico, Tlaxcala, Michoacan, and Hidalgo. It is an introduced species (Cubero y Moreno 1983) and is considered an alternative cultivation with economic potential, as within the last ten years dry faba bean reached market prices between 4 and 5 USD per kilogram, superior to those of maize, wheat and other legumes. However, in recent decades the production has noticeably decreased, mainly due to conditions of biotic and abiotic stress, so it is necessary to generate materials that counteract side effects; to do so, it is necessary to learn the degree of diversity and relation between accessions by means of characterization, not only agromorphological but also at molecular level, which in our country is incipient and necessary.

Duc et al. (2010) mention that at global level faba bean is only represented in herbarium collections and germplasm banks, so genetic resources represented through wild species, cultivated plants, local accessions, varieties, hybrid lines, and elite lines are important as gene sources. So when a germplasm, diversity and relationship between materials are unknown; characterization of genetic variability and selection of population are important in the efficiency of breeding programs (Alghamdi et al., 2012a).

Even if there is a taxonomic relation between faba bean cultivars according to van de Ven et al. (1993) and studies of agromorphological characterization which have served to learn important aspects of the cultivation (Terzopoulos et al., 2003, 2004; Ahmed et al. 2010, Vörösváry et al, 2011; Yahia et al., 2012), these present certain limitations, since characterizations may have been affected by the stage and development of the plant, environmental influence, agronomic management or else, reveal scarce genetic variability.

Alghamdi et al. (2012a) comment that the genetic diversity of faba bean has been studied with different molecular markers, as it is reported by Link et al. (1995), who studied the genetic variability of accessions of faba bean from the Mediterranean Sea and Europe by means of Random Amplified Polymorphic DNA, detecting variability; Kwon et al. (2010) analyzed the genetic diversity and relation between 151 accessions by means of Target Region Amplification Polymorphism (TRAP) finding 55.2% of polymorphism, sufficient to classify the genotypes; Liu and Hou (2010) studied the genetic diversity of germplasm from Western China by means of Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) markers finding seven groups that represented 80% of the assessed genetic information. Gong et al. (2010) generated and characterized 11 new EST type sequences derived from faba bean microsatellites; in like manner, Gong et al. (2011) analyzed the genetic diversity of 5031 faba bean accessions from Europe and China, indicating that only 8.36% of the sequences had Simple Sequence Repeats (SSR); Oujii et al. (2012) examined nine populations of faba bean from Tunisia by means of Simple Sequence Amplified Polymorphism (SSAP), finding broader diversity in the populations than between them; Alghamdi et al. (2012b) studied 58 faba bean genotypes using Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP), detecting broad genetic variability between the assessed accessions; Akash and Myers (2012) developed Expressed Sequence Tags and Simple Sequence Repeats (EST-SSRs) to validate the diversity analysis of 20 faba bean populations from Jordan; Ma et al. (2013) used SSR markers to produce related maps between faba bean varieties native to China, these markers can be applied in Quantitative Trait Loci (QSL) and selection of assisted markers.

However, Alghamdi et al. (2012a) indicate that Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) have been efficient in the study of genetic diversity and the relation between faba bean populations. Using this sort of markers, Wang et al. (2012) analyzed 802 faba bean accessions from China and other parts of the world, they found well-defined groupings of accessions according to the geographic region these accessions came from; Abdel-Razzak et al. (2012) studied 10 faba bean varieties from Egypt finding

differences between cultivars; Alghamdi et al. (2011) assessed 34 faba bean populations detecting variability related to the gathering sites; finally, Terzopoulos and Bebeli (2008) analyzed the genetic diversity of 20 local populations from the Mediterranean, finding high variation levels in them and at least two genetically different groups.

Due to the agronomic and economic interest this species represents, the objective of this work was to determine the genetic variability and relationship between 39 faba bean populations by means of ISSR molecular markers, in view of identifying and selecting genetically contrasting accessions. The results of this work will allow using the detected genetic variability and incorporating it in current genetic improvement programs, which consist in phenotyping and genotyping, schemes aimed at increasing production, generating resistance or tolerance to biotic and abiotic stress, and even creating high-performing and stable materials suitable for various environmental conditions.

MATERIALS AND METHODS

Vegetal material

In this study we used seeds from 35 faba bean populations, collected because of their best agromorphological characteristics in 12 municipalities of the State of Mexico, and four varieties generated by the Institute of Agricultural, Aquaculture and Forestal Research and Training of the State of Mexico (ICAMEX), namely: “San Isidro” (P29), “Monarca” (P30), “Diamante” (P31) and “San Pedro” (P32). The identification code, geographic origin, gathering place, seed size and color of the 39 assessed accessions, altitude and geographic coordinates collection sites are summarized in Table 1.

DNA extraction and ISSR analysis

Three grams of fresh foliar tissue from seedling of 14 days of age, healthy and without mechanical damage were selected at random out of a group of ten and weighed for each of the 39 populations. DNA extraction was carried out according to the sodium dodecyl sulfate method by Dellaporta et al (1983) with lesser modifications, such as the addition of 0.5 mM ascorbic acid, as suggested by Hoelzel (1992) to reduce oxidation. The quality of DNA was evaluated by means of electrophoresis in agarose gel at 0.8%. The utilized oligonucleotides belong to a set of 100 ISSR molecular markers “UBC primer set 100/9” of British Columbia University; of these, 40 were evaluated. The ISSR-PCR reactions were performed using a volume of 25 μL reaction mixture, containing 5.2 μL water, 10 μL 0.2 mM dNTP's, 2.5 μL Tris H-Cl pH 8 10Xbuffer, 1.5 μL 3 mM MgCl_2 , 3 μL of primer at a concentration of 10 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$, 0.3 μL 1.5 U of Taqpolimeraseenzyme and 2.5 μL of template DNA at a concentration of 10 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ of DNA.

Amplifications were carried out in a TECHNE thermal cycler TC-412 (Bibby Scientific Limited, Beacon Road, Stone, Staffordshire, UK) considering a pre-denaturalization cycle at 93°C for 20 s, followed by 40 cycles for the denaturalization stage at 94°C for 20s; one aligning phase at

temperatures defined according to the primer to amplify for 1 min and a polymerization stage at 72°C for 20s; finally an additional cycle to end up polymerization at 72°C for 6 min. The products of the amplification of the assessed primers were separated in a horizontal electrophoresis chamber SGV-2626T-02 (CBS, Scientific, San Diego, California, USA) in ultrafine agarose gels at 2%. Later on, they were developed in a solution with 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of ethidium bromide and finally visualized and analyzed in a high-performance UV transilluminator (Analytik Jena AG, Jena, Germany). The visualized bands were registered and identified, considering 1 presence and 0 absence.

Data analysis

Only consistent and reproducible bands were considered to run the corresponding statistical analyses. DNA polymorphic bands were registered as discrete variables considering “1” presence and “0” absence to construct a binary data matrix. Later on, data were processed in FreeTree statistics software (Version 0.9.1.5) Pavlicek et al. (1999) to produce a genetic distance matrix using Dice coefficient, also known as the similarity coefficient Nei and Li (1979). The resulting matrix was analyzed according to the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA), so as to build a dendrogram with 1000 bootstrap replicates. Tree View software was used to visualize the obtained dendrogram.

The informational certainty of primers to difference between accessions was analyzed by means of the estimation of their Polymorphic Information Content (PIC), Marker Index (MI) and Resolution power (Rp). PIC was calculated using the formula described by Roldán-Ruíz et al. (2000), which is: $PIC_i = \frac{2f_i}{(1-f_i)}$, where: PIC_i is the polymorphic information content of the first i , f_i is the frequency of the present bands, and $(1-f_i)$ represents the frequency of the absent bands. Considering that the highest value of PIC for dominant markers is 0.5 according to De Riek et al. (2001). MI was calculated following Prevost and Wilkinson (1999), as $MI = PIC \times \text{number of polymorphic bands}$, and Rp

according to the formula by Gilbert et al. (1999), $R_p = \sum I_b$, in where I_b represents the information of the band, which was calculated with: $I_b = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$, where p is the proportion of accessions that contain bands and l represents the percentage of polymorphic bands (PPB). The origin of the accessions was also considered to examine the potential effect of genetic grouping.

The Principal Component Analysis (PCA) was obtained analyzing the correlation of the binary data matrix in GenAlEx 6.501 software (Peakall and Smouse, 2006; 2012) and interpreted according to the three main first coordinates.

RESULTS AND DISCUSSION

Polymorphism of ISSR markers

Out of the 40 assessed primers only 12 amplified clear, sharp and reproducible polymorphic bands. The names, nucleotide sequences, alignment temperatures, results of the amplification and polymorphism of the utilized markers are shown in Table 2.

The ISSR primers produced a total 142 fixed and repeatable bands; of which 134 were polymorphic with a banding mean of 19.6 for primers 848, 857, and ISSR-2M; while for the rest the mean of bands was 10.1. The size of bands according to molecular weights marker varied from 400 to 5000 bp. The values of Rp, PIC, and MI indicated that primer 848 (Figure 1) was the most efficient to analyze genetic variability with values of 12.8, 0.40, and 8.06, respectively, followed by primers 857, and ISSR2M, which also showed efficiency in the polymorphic amplicons generated. Such results allow distinguishing that primers 848 and ISSR-2M, amplified 20 and 18 total bands and for both 100 % were polymorphic, these are dinucleotides of (CA) anchored to tetra- and penta-nucleotides, these two primers and 866 are nucleotide sequences, still unreported by other researchers to amplify polymorphic bands in faba bean (Terzopoulos and Bebeli 2004; Abdel Razzak et al., 2012) had already assessed a similar (CA)₈G sequence in Greece and Egypt, respectively. By contrast, Terzopoulos and Bebeli (2008), Alghamdi et al. (2011), and Wang et al. (2012) assessing faba bean accessions from Greece, Saudi Arabia, and China, respectively, found higher polymorphism with primers of dinucleotide replications (AG) and (GA) anchored to mononucleotides and trinucleotides; sequences which were also detected in our materials but with fewer total bands. This suggests gene differences between the gathered material assessed in this study and those reported for faba bean cultivars in other countries; such a genetic difference can be attributed to the broad geographic separation there is between the

materials. So the primers rich in (CA) may be assessed with faba bean accessions from other continents in order to verify the gene similitude or difference and suggest possible phylogenetic relations, for according to Wang et al. (2012), faba bean accessions from China have their origin in gene sources from Africa, Asia and Europe, while there are no reports about this for accessions from the American continent.

Genetic similarity between accessions

The genetic relation between accessions was obtained by means of data analysis of ISSR markers, using Dice's similarity coefficient. The matrix of genetic distances showed an average range from 0.38 to 0.83 (Table 3). Which indicates there is high DNA variability between accessions P25 and P37, both belong to the municipality of Santiago Tianguistenco; this suggests they are genetically different materials adapted to the same environment, even though from a different origin. This can be advantageous in programs of genetic improvement, as it is commented by Gresta et al. (2009), the use of this sort of materials might be used to maximize the level of variation and then assess these cultivars in contrasting environments that allow broadening their diversification. The longest distance value was registered between P22 and P23, which suggests great genetic similarity, it can even be suggested that these populations come from one same accession, due to the closeness of the gathering places (Santiago Tianguistenco and Santa Cruz Atizapan) and the mobility of the materials the growers make. Other very closely related accessions were: P10 and P11, P21 and P22, P14 and P23, P2 and P4, P13 and P20. The rest of accessions displayed intermediate similarity levels.

Genetic variability between populations

The genetic variability described in Table 3 was verified with UPGMA analysis (Figure 2). The dendrogram shows six principal groups (I, II, III, IV, V, VI). Groups III and IV were integrated by accessions P25 and P29, respectively from Santiago Tianguistenco and Metepec; this indicates these

accessions were significantly different at molecular level in relation to all the accessions. The genetic variability observed in accession P25 can be related to a differential response to biotic or abiotic stress, to the agronomic management or else to its facility to adapt to other environments, as it is commented by Duc et al. (2010), variability can be the result from such factors. As for accession P29, it is one of the varieties generated by ICAMEX (2004). The detected genetic variability is attributed to the fact that one of its progenitors has its origin in the Middle East, in Syria, and is characterized by registering the highest yields of green pod and dry grain under adequate management conditions and good development of the cultivation in respect to the rest of varieties (ICAMEX, 2004), so this accession can be used in improvement programs heading to increase yield. Similarly, it was observed that group I comprised only two accessions, P38 and P37, which belong to the geographic places farthest apart in the study zone. It is worth mentioning that P38 is a population in which land is worked above 2500 m as indicated in Table 1, which suggests that the altitude factor heavily influences on its genetic expression, making it different. These results agree with reports by Terzopoulos and Bebeli (2008) and Wang et al. (2012), who comment that genetic diversity in faba bean is closely associated to the habitat in which it grows, geographic origin, and ecologic distribution. Group II comprehended 60% of the accessions of the central part, as well as two accessions from the north and south, P8 and P34, respectively. Accession P8, from its grouping, indicates that it is possibly a material with genes adaptive to agro-ecological contrasting conditions; these can be useful to broaden the variability level, Gresta et al. (2009). Group V comprised five accessions that belonged to the municipality of Acambay, located in the north; these accessions are characterized by its small seeds and a precocious cycle. Whereas group VI was the largest and grouped 84% of the accessions from the southeast study zone; in this group the presence of subgroups is distinguishable, possibly from the high mobility of the growers in the zone, since this is the largest zone to buy and sell seeds in the regions. The accessions in this group have a large seed and long cycle. Accessions P6, P7, and P9 from the north, and P26 and P31

were also part of this grouping. Similar results were found by Alghamdi et al. (2011), who comment that the presence of subgroups indicates genetic variability related to adaption to gathering sites and that such differences may be utilized as gene sources to generate lines for the development of synthetic varieties. By and large, the dendrogram allows inferring that groupings were determined partly by its geographic origin, as well as by the genetic differences and similarities accumulated through time, sort of reproduction of faba beans, which are partially allogamous, the constant mobility of the materials the growers make and the facility of the species to adapt to different microenvironments.

The PCA results reveal that the first three axes represent only 33.99% of the total variability, of these; the two first coordinates accumulated 24.41% of variability and the first 13.45%. Moreover, in this analysis three main groups (A, B, and C) and an independent one, comprising P7 (Figure 3), are observed. The dendrogram and PCA of the present study verified similarity between populations and variability was preserved; these results agree with Wang et al. (2012), who also observed congruency between both analyses, perhaps because they worked with faba bean accessions very distant geographically. It is worth mentioning that accessions P25 and P29, which appeared independent in the dendrogram, in PCA they grouped in B; whilst P37 and P38 in A. On its own, group C, held 80% of the northern populations. Distinguishable is that accession P7 separated from the rest of populations (locating at -7.02, axis 2); a situation that was not observed in the dendrogram, this indicates it is a different material in molecular terms. This accession is cultivated at average altitudes of 2800 m (Table 1). Finally, it is indicated that accessions P25, P29, P37, P38, P8, and P7 are molecularly different and can be assessed in the field to determine their agromorphological qualities and determine their agronomic potential. These accessions represent 15.3% of the total assessed material, nevertheless, this minimal variability is considered sufficient to broaden the genetic base of the species in the highlands of Mexico.

Conclusions

Molecular markers ISSR-2M, 848 and 866 are gene sequences that broadened the highest percentage of polymorphic bands for the gatherings of faba bean here analyzed, such sequences might be utilized to genotype accessions from other countries and generate sufficient information to infer possible phylogenetic relations. The use of molecular ISSR markers was efficient to detect differences between the assessed populations, indicating that in 15.3% of the accessions important genetic variability was registered; this variability can be selected and valued in the field to learn their agronomic potential and later incorporation in improvement programs. The experience of the present research allows reflecting on the need to analyze a larger number of faba bean accessions from all over the country in views of broadening the studies of variability at the level of DNA, not only to contribute to genetic improvement, but also to preserve germplasm and create outstanding genotypes for the alimentary industry.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the financial support to carry out this project to the Universidad Autónoma del Estado de México, México.

LITERATURE CITED

- Abdel-Razzak, H.S., A.M. Alfrmawy, H.M. Ibrahim, and A.A. El-Hanafy. 2012. Genetic diversity in faba bean (*Vicia faba* L.) using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers and protein analysis. *Life Science Journal* 9(2):497-503.
- Ahmed, A.M.O., O.Y. Samia, and A.T. Olway. 2010. Performance of faba beans (*Vicia faba* L.) cultivars grown in new agro-ecological region of Sudan (Southern Sudan). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 4(11):5516-5521.
- Akash, M.W. and G.O. Myers. 2012. The development of faba bean expressed sequence tag-simple sequence repeats (EST-SSRs) and their validity in diversity analysis. *Plant Breeding* 131:522-530. doi:10.1111/j.1439-0523.2012.01969.x.
- Alghamdi, S.S., H.M. Migdadi, M.H. Ammar, J.G. Paull, and K.H.M. Siddique. 2012a. Faba bean genomics: current status and future prospects. *Euphytica* 186:609-624. doi:10.1007/s10681-012-0658-4
- Alghamdi, S.S., S.A. Al-Faifi, H.M. Migdadi, M.A. Khan, E.H. El-Harty, and M.H. Ammar. 2012b. Molecular diversity assessment using sequence related amplified polymorphism (SRAP) markers in *Vicia faba* L. *International Journal and Molecular Sciences* 16457-16471. doi:10.3390/ijms131216457.
- Alghamdi, S.S., S.A. Al Faifi, H.M. Migdadi, M.H. Ammar, and K.H.M. Siddique. 2011. Inter-simple sequence repeat (ISSR)-based diversity assessment among faba bean genotypes. *Crop Pasture Science* 62(9):755-760. doi.org/10.1071/CP11045.
- Cubero, J.I. y N.T. Moreno. 1983. *Leguminosas de grano*. Ed. Mundi Prensa, Madrid, España.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant mini preparation: version II: *Plant Molecular Biology Reports* I: 19-20. doi:10.1007/BF02712670.
- De Riek, J., E. Calsyn, I. Everaert, E. Van Bocksteal, and M. De Loose. 2001. AFLP based alternative for the assessment of the distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. *Theoretical and Applied Genetics* 103:1254-1256. doi:10.1007/s001220.100710.
- Duc, G.S.Y. Bao, M. Baum, B. Redden, M. Sadiki, M.J. Suso, M. Vishniakova, and X.X. Zong. 2010. Diversity maintenance and use of *Vicia faba* L. genetic resources. *Field Crops Research* 115:270-278. doi:10.1016/j.fcr.2008.10.003.
- Gilbert, J.E., R.V. Lewis, M.J. Wilkinson, and P.S.D. Caligari. 1999. Developing and appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theoretical and Applied Genetics* 98:1125-1131. doi:10.1007/s001220051176.

- Gong, Y.M., S.C. Xu, W.H. Mao, Q.Z. Hu, G.W. Zhang, J. Ding, and Z.Y. Li. 2010. Generation and characterization of 11 novel EST derived microsatellites from *Viciafaba* (Fabaceae). *American Journal of Botany* e69-e71. doi:10.3732/ajb.1000166.
- Gong, Y.M., S.C. Xu, W.H. Mao, Z.Y. Li, Q.Z. Hu, G.W. Zhang, and J. Ding. 2011. Genetic diversity analysis of faba bean (*Viciafaba* L.) based on EST-SSR markers. *Agricultural Sciences in China* 10(6): 838-844. doi:10.1016/S1671-2927(11)60069-2.
- Gresta, F. G. Avola, E. Albertini, L. Raggi, and V. Abbate. 2009. A study of variability in the Sicilian faba bean landrace “Larga di Leonforte”. *Genetic Resources and Crop Evolution* 123-131. doi:10.1007/s10722-009-9490-7.
- Hoelzel, A.R. 1992. *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. First edition. New York: Oxford University Press.
- ICAMEX. 2004. *Tecnologías de producción del cultivo de haba*. Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX). Toluca, México.
- Kwon, S.J., J. Hu, and C.J. Coyne. 2010. Genetic diversity and relationship among faba bean (*Viciafaba* L.) germplasm entries as revealed by TRAP markers. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 8(3):204-213. doi:10.1017/S1479262110000201.
- Link, W., C. Dixkens, M. Singh, M. Schwall, and A.E. Melchinger. 1995. Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germplasm revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 90:27-32. doi:10.1007/BF00220992.
- Liu, Y. and W. Hou. 2010. Genetic diversity of faba bean germplasms in Qinghai and core germplasm identified based on AFLP analysis. *Legume Genomics and Genetics*. 1(1):1-6. doi:10.5376/lgg.2010.01.0001.
- Ma, Y., S.Y. Bao, T. Yang, J.G. Hu, J.P. Guan, Y.H. He, et al. 2013. Genetic linkage map of Chinese native variety faba bean (*Viciafaba* L.) based on simple sequence repeat markers. *Plant Breeding* 132:397-400. doi: 10.1111/pbr.12074.
- Maalouf, F., S. Khalil, S. Ahmed, A.N. Akintunde, M. Kharrat, K.E. Shama'a, S. Hajjar, and R.S. Malhotra. 2011. Yield stability of faba bean lines under diverse broomrape prone production environments. *Field Crops Research* 24:288-294. doi:10.1016/j.fcr.2011.06.005.
- Nei, M., and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 76:5269-5273. PMC413122.

- Ouji, A., S. El Bok, N.H. Syed, R. Abdellaoui, M. Rouaissi, A.J. Flavell, and M. El Gazzah. 2012. Genetic diversity of faba bean (*Vicia faba* L.) populations revealed by sequence specific amplified polymorphism (SSAP) markers. *African Journal of Biotechnology* 11(9):2162-2168. doi:10.5897/AJB11.2991.
- Pavlicek, A., S. Hrda, and J. Flegl. 1999. FreeTree-Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and for bootstrap jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. *Folia Biology* (Prague). 45:97-99.
- Peakall, R., and P.E. Smouse. 2012. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28:2537-2539.
- Peakall, R., and P.E. Smouse. 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288-295.
- Prevost, A., and M.J. Wilkinson. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 98:107-112.
- Roldán-Ruíz, I., J. Dendauw, E. Van Bockstaele, A. Depicker, and M. De Loose. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in Ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding* 6:125-134. doi:10.1023/A:1009680614564.
- Terzopoulos, P.J., P.J. Kaltsikes, and P.J. Bebeli. 2003. Collection, evaluation and classification of Greek populations of faba bean (*Vicia faba* L.) Genetic Resources and Crop Evolution 50:373-381. doi:10.1023/A:1023962618319.
- Terzopoulos, P.J., P.J. Kaltsikes, and P.J. Bebeli. 2004. Characterization of Greek populations of faba bean (*Vicia faba* L.) and their evaluation using a new parameter. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51:655-662. doi:10.1023/B:GRES0000024654.89373.c2
- Terzopoulos, P.J., and P.J. Bebeli. 2008. Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers. *Field Crops Research* 108(1):39-44. doi:10.1016/j.fcr.2007.08.006.
- van de Ven, W.T., N. Duncan, G. Ramsay, M. Phillips, W. Powell, and R. Waugh. 1993. Taxonomic relationships between *V. faba* and its relatives based on nuclear and mitochondrial RFLPs and PCR analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 86(1):71-80. doi:10.1007/BF00223810.

- Vörösváry, G., L. Holly, S. Strajeru, J. Tamás, D. Constantinovici, G. MálnásiCsizmadia, and L. Horváth. 2011. Studies on the variation of agronomic traits in some faba bean (*Viciafaba* L.) landraces from Romania. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine. Horticulture 68(1):279-283. Print ISSN 1843-5254; Electronic ISSN 1843-5394.
- Wang, H.F., X. Zong, J.P. Guan, T. Yang, X.L. Sun, Y. Ma, and R. Redden. 2012. Genetic diversity and relationship of global faba bean (*Viciafaba* L.) germplasm revealed by ISSR markers. Theoretical and Applied Genetics 124:789-797. doi:10.1007/s00122-011-1750-1.
- Yahia, Y., A. Guetat, W. Elfalleh, A. Ferchichi, H. Yahia, and M. Loumerem. 2012. Analysis of agromorphological diversity of southern Tunisia faba bean (*Viciafaba* L.) germplasm. African Journal of Biotechnology 11(56):11913-11924. doi:10.5897/AJB11.3366.

Table 1. Identification code, seed characteristics, gathering place, altitude and geographic coordinates of the 39 assessed accessions.

| Identification code | Size, color of dry seed | Gathering place | Altitude (m.a.s.l.) | Geographic coordinates |
|---|---|-------------------------|---------------------|----------------------------------|
| P1, P2, P3, P4, P5, P6, P8, P9 | Small, yellow head | Acambay | 2440 | 19° 57' 16'' N 99° 50' 39'' W |
| P7 | | Jocotitlán | 2200-3400 | 19° 42' 26'' N 99° 47' 12'' W |
| P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P34 | Large, yellow head | Calimaya | 2690 | 19°10' 25'' N 99°37' 02'' W |
| P20 | Large, yellow head | Mexicaltzingo | 2600 | 19° 13' 15'' N 99° 33' 05'' W |
| P23 | Large, yellow head | Santa Cruz Atizapán | 2600 | 19° 09' 27'' N 99° 29' 19'' N |
| P21, P22, P24, P25, P37 | Large, yellow head | Santiago Tianguistenco | 2622 | 19° 10' 08'' N 99° 28' 01'' W |
| P26, P33, P35 | Mid-sized, yellow-light brown head | Toluca | 2680 | 19° 17' 32'' N 99° 39' 14'' W |
| P27 | Mid-sized, yellow-light brown head | Zinacantepec | 1160 | 19°17' 00'' N 99° 44' 00'' W |
| P28 | Large, yellow head | Almoloya del Rio | 2610 | 19°10' 00'' N 99° 29' 00'' W |
| P29, P30, P31, P32, P39 | Small to mid-sized , light brown to brown marbled** | Metepec | 2635 | 19° 15' 04'' N 99° 36' 17'' W |
| P36 | Mid-sized yellow to ,light brown head | Lerma | 2570 | 19° 17' 05'' N 99° 30' 43'' W |
| P38 | Small , yellow to ,light brown head | San Felipe del Progreso | 2570-2650 | 19° 57' 16'' N 99° 50' 39'' W |

Table 2. Results from amplification and polymorphism of 12 ISSR primers used in this study.

| Primer | Sequence | | AT (°C) | TB | PB | PPB | Rp | PIC | MI |
|---------|----------|-------|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | (5' | 3') | | | | | | | |
| 807 | (AG)8 | T | 55 | 11 | 11 | 100 | 4.00 | 0.26 | 2.95 |
| 808 | (AG)8 | C | 52 | 7 | 6 | 85.7 | 2.41 | 0.27 | 1.63 |
| 810 | (GA)8 | T | 51 | 12 | 12 | 100 | 5.43 | 0.29 | 3.57 |
| 811 | (GA)8 | C | 53 | 9 | 9 | 100 | 3.17 | 0.27 | 2.44 |
| 812 | (GA)8 | A | 54 | 7 | 5 | 71.4 | 1.84 | 0.24 | 1.23 |
| 818 | (CA)8 | G | 55 | 7 | 5 | 71.4 | 1.07 | 0.18 | 0.92 |
| 841 | (GA)8 | CTC | 53 | 10 | 8 | 80.0 | 3.28 | 0.29 | 2.34 |
| 842 | (GA)8 | CTG | 58 | 12 | 12 | 100 | 6.71 | 0.36 | 4.32 |
| 848 | (CA)8 | AAGG | 61 | 20 | 20 | 100 | 12.8 | 0.40 | 8.06 |
| 857 | (AC)8 | CTG | 54 | 21 | 21 | 100 | 11.6 | 0.36 | 7.64 |
| 866 | (CTC)6 | | 61 | 8 | 7 | 87.5 | 2.61 | 0.28 | 1.97 |
| *ISSR2M | (CA)8 | AAGCT | 61 | 18 | 18 | 100 | 9.43 | 0.33 | 6.06 |
| Average | | | | 11.8 | 11.1 | 91.3 | 5.36 | 0.29 | 3.59 |

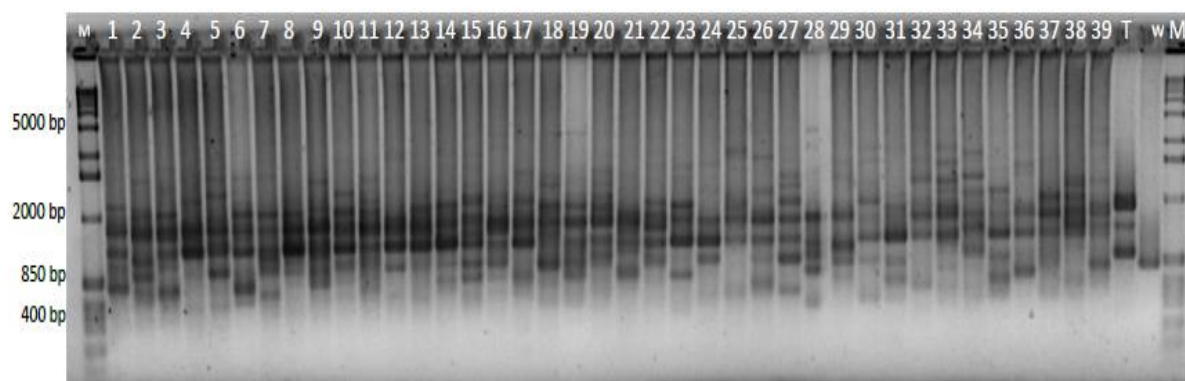


Figure 1. Electrophoresis in agarose gel at 2% of 39 faba bean populations, using primer ISSR 848. M: molecular weights marker; T: non-related species, W: water.

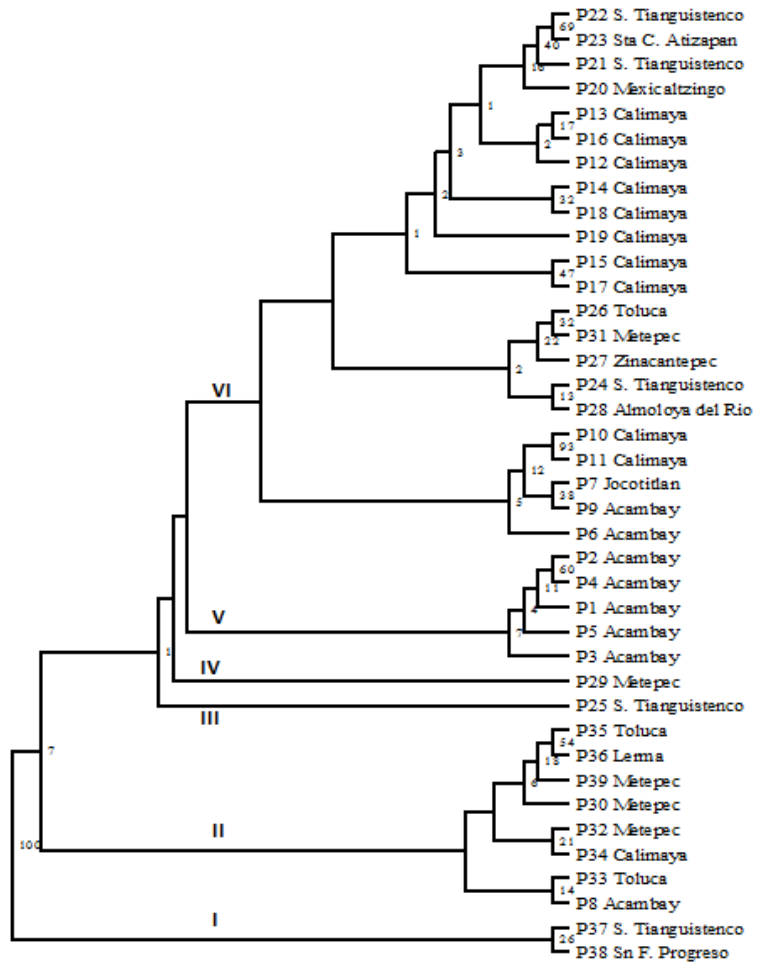


Figure 2. Dendrogram from the UPGMA grouping analysis, using Dice coefficient and ISSR molecular markers in 39 faba bean populations; the number of nodes indicates the percentage obtained with 1000 bootstrapping.

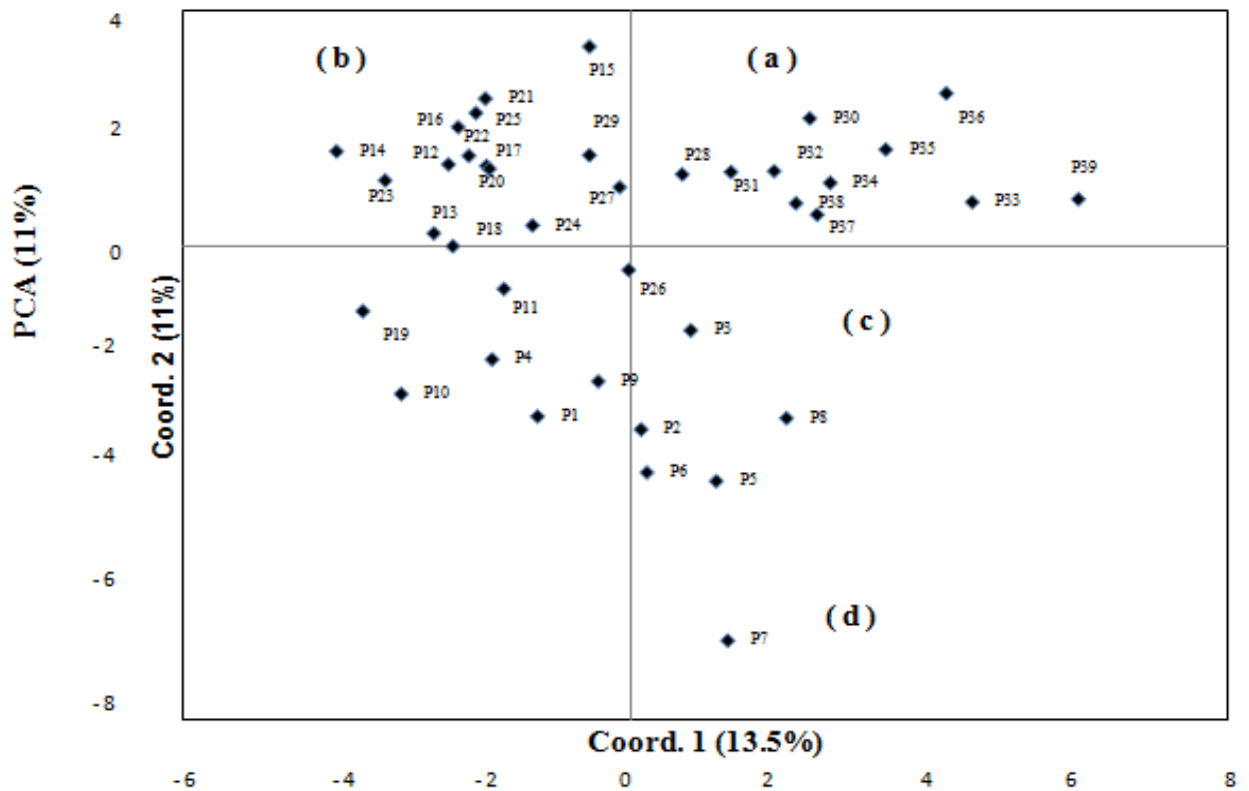


Figure 3. PCA results of the two first discriminating axes for the 39 faba bean accessions produced by 12 ISSR markers.

PHYTON

INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY

REVISTA INTERNACIONAL DE BOTANICA EXPERIMENTAL

Founded 1951 by/ Fundada en 1951 por Miguel Mario Raggio & Nora Moro-Raggio

Editor Fundador Dr. Miguel M Raggio, Editor Ejecutivo Dr. Carlos A Busso

PUBLICADA POR/ PUBLISHED BY: Fundación Rómulo Raggio

Gaspar Campos 861 / 1638 VICENTE LOPEZ / ARGENTINA Telefax: 54-11-47910868

E-mail: fund_r_raggio@hotmail.com

Manuscrito no: 21

Autores: M. E. Salazar-Laureles, D. de J. Pérez-López, C. Aguilar-Ortigosa, A. González-Huerta, L.M. Vázquez-García

Fecha envío el revisor:

Fecha esperada de respuesta:

Comentarios:

El manuscrito contiene información que podría ser valiosa para un programa de mejoramiento. Sin embargo, la forma en la que se presenta la información (tanto en el texto como en las figuras) no es la adecuada. Además, el lenguaje que se utiliza en varias frases del manuscrito es muy informal, coloquial y debe ser modificado. Por lo tanto, considero que el trabajo podría ser publicable luego de una revisión mayor.

A continuación (y en el manuscrito) se presentan algunas consideraciones que podrían servir para mejorar el trabajo.

Título:

Debería ser más amplio porque también se realizó una caracterización molecular.

Palabras claves:

Elegir otras palabras claves. "Caracterización molecular y agromorfológica" no es una palabra clave y además "agromorfológicos" es una palabra que se encuentra en el título.

Resultados:

Caracterización molecular: La figura 1 no está disponible. En el texto se menciona el agrupamiento según los marcadores pero no hay información acerca de la variabilidad encontrada dentro de las poblaciones.

Caracterización morfológica: En MyM se describe el análisis mediante ANOVA aunque en los resultados no se presentan. La forma en la que se presentan los resultados no resulta informativa para el lector. Los autores deberían presentar una tabla con los valores medios (y algún estimador de la varianza) para cada parámetro y después recurrir a algún análisis multivariado, pero incluyendo todas las variables posibles, para poder diferenciar fenotípicamente las poblaciones y determinar cuáles son los parámetros que más están discriminando.

A lo largo del manuscrito se menciona el término agro-morfológico. Consideran, los autores, que todos los caracteres que se midieron tienen implicancia en el rendimiento? Antocianinas? Extensión de la coloración de las antocianinas en la flor? Mancha de melanina en el estandarte? Color del follaje? Longitud de la flor? Tal vez merezca un término más amplio como "morfológico" "fenotípico".

Discusión:

Los autores intentan asociar los marcadores (moleculares y morfológicos) con la ubicación geográfica, aunque a simple vista (Tabla 1) las poblaciones no se encuentran separadas a gran distancia ni tampoco la altura pareciera ser un variable discriminante (en la mayoría de las poblaciones). ¿Que otra variable ambiental podría estar influenciando esa diferenciación?

Artículo II:

Variabilidad fenotípica en colectas de haba provenientes del Valle Toluca-Atlacomulco, México

Phenotypic variability in faba bean accessions from Toluca-Atlacomulco Valley, Mexico

María Elena Salazar-Laureles¹, Delfina de Jesús Pérez-López^{1*}, Andrés González-Huerta¹, Luis Miguel Vázquez-García, y Carlos Aguilar-Ortigosa²

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México. El Cerrillo Piedras Blancas, Municipio de Toluca, México. Teléfono: (+52) 722 2965518. Ext. 148.

²Centro Universitario UAEM Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México. Km 1.5 Carretera Tenancingo-Villa Guerrero, México. C.P. 52414.

³Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México. El Cerrillo Piedras Blancas, Municipio de Toluca, México.

Runnig title: **Phenotypic variability in bean**

(Con 7 Tablas y 2 Figuras)

Corresponding author: Dra. Delfina de Jesús Pérez López. Fax and Phone: (+52) 722 2965518. Ext. 148. E-mail: djperezl@uaemex.mx

Operating System and Word Processor: Windows XP - Microsoft Word 2003

Abstract. This research was carried out during spring-summer 2013 in San Mateo Atenco, State of Mexico, Mexico, in order to estimate the components of variance and inheritability in 39 faba bean cultivars and to identify the outstanding genetic material from quantitative and qualitative characters. An experimental design of full blocks at random with three repetitions was utilized. The qualitative characters were described according to the Technical Guide for Varietal Description in Faba Bean by the National Service of Seed Inspection and Certification (Mexico). The results showed statistical significance ($P \leq 0.01$) between cultivars for each quantitative character. Inheritability in a broad sense varied from 30.7 to 99%. The highest seed performance was registered in collections identified as T8 (4.16 t ha⁻¹), T5 (3.90 t ha⁻¹) and T 27 (3.80t ha⁻¹). Principal component analysis explained 65.2% of the total original variation and in this it was observed that performance positively and significantly correlated with the number of pods, pod weight and seed weight. In the conglomerate analysis four groups were formed. The analysis of conglomerates allowed identifying four groups, of which group 3 comprised the populations with the best agronomic descriptors assessed.

Key words: Morphological and agronomical character analysis, multivariate analysis, Central Mexico highlands, *Vicia faba* L.

Resumen. Este estudio se realizó en el ciclo primavera verano del 2013 en San Mateo Atenco, estado de México, México, con el objetivo de estimar los componentes de varianza y la heredabilidad en 39 cultivares de haba e identificar material genético sobresaliente a partir de caracteres cuantitativos y cualitativos. Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones. Los caracteres cualitativos se describieron de acuerdo con la Guía Técnica para la Descripción Varietal en Haba del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). Los resultados mostraron significancia estadística ($P \leq 0.01$) entre cultivares para cada carácter cuantitativo. La heredabilidad en sentido amplio varió de 30.7 a 99%. El mayor rendimiento de semilla se registró en las colectas identificadas como T8 (4.16 t ha^{-1}), T5 (3.90 t ha^{-1}) y T 27 (3.80 t ha^{-1}). El análisis de componentes principales explicó el 65.2 % de la variación total original y en éste se observó que el rendimiento se correlacionó positiva y significativamente con número de vainas, peso de vainas y peso de semilla. En el análisis de conglomerados se formaron cuatro grupos.

Palabras clave: Análisis de caracteres morfológicos y agronómicos, Análisis multivariados, Valles Altos del Centro de México, *Vicia faba* L.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la variabilidad basada en los rasgos morfológicos y agronómicos es una herramienta fundamental en los esquemas de mejoramiento genético y en la conservación eficiente de germoplasma (Pearce et al., 2000, Cordeiro et al., 2003). El haba es una especie parcialmente alógama, lo que hace más caro y difícil el mantenimiento de la identidad genética de los cultivares (Duc et al., 2010; Pearce et al., 2000), por ello los materiales criollos o nativos que a través del tiempo han fijado genes de interés, representan una importante fuente de germoplasma (Yahia et al., 2012).

Desde hace dos décadas se han hecho estudios intensivos sobre la variabilidad fenotípica que existe en caracteres de interés agronómico: en el Mediterráneo, Suso et al. (1993) y Terzopoulos et al. (2003); en Alemania y Francia se ha encontrado amplia variabilidad en floración, precocidad, hábito de crecimiento, arquitectura del tallo, longitud de entrenudos, número de ramas, tipo de crecimiento y rigidez del tallo (Arbaoui et al., 2008); en Siria se ha reportado amplia diversidad en la pigmentación del tallo, tamaño y forma de los foliolos, color de la mancha de melanina en el ala y el estandarte, ángulo, forma, superficie, color y distribución de las vainas, y en diversos colores en la semilla, en la testa y en el *hilium* (Robertson y El-Sherbeeney, 1991); en Etiopía las habas son diferentes principalmente en el tamaño de las hojas y en la posición y color de las vainas. En China, Li-juan et al. (1993) encontraron que los cultivares se diferenciaron básicamente en el tamaño de la vaina, en el número de semillas por vaina y en el color de la semilla. La sanidad, el tamaño y el color de las semillas son características muy importantes para los agricultores mexicanos y ellos los

emplean para la identificación de cultivares sobresalientes (Díaz et al., 2008; Rojas et al., 2012).

Duc et al. (2010) reportaron cerca de 38 000 accesiones de haba agrupadas en 37 colecciones, la mayoría provenientes de Asia, África y Europa. En América, y particularmente en México, no se cuenta con un banco de genes que resguarde la diversidad genética del germoplasma existente. El mejoramiento genético y la generación de tecnología en esta leguminosa es incipiente; los agricultores de esta región del Centro de México son los poseedores de las poblaciones nativas que ellos han seleccionado empíricamente y también lo son del paquete tecnológico que usan en su explotación (Orozco et al., 2013; Rojas et al., 2012; Díaz et al., 2008; Pérez et al., 2007).

En el contexto anterior, el objetivo principal del presente estudio fue describir 27 caracteres agronómicos en 39 cultivares de haba colectadas en el Valle Toluca-Atlacomulco, México, con base en la Guía Técnica para la Descripción Varietal de Haba del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS, 2001) para identificar materiales sobresalientes que permitan su recomendación en siembra comercial, para iniciar nuevos programas de fitomejoramiento o para generar tecnología.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del área de estudio

Este estudio se realizó en el ciclo primavera verano del 2013 en el Barrio de Guadalupe, Municipio de San Mateo Atenco, Estado de México, México, ubicado a $99^{\circ} 31' 10''$ LN y $99^{\circ} 34' 05''$ de LO, a 2570 msnm. Los suelos predominantes son de origen aluvial y el 87 % de su superficie son del tipo feozem. El clima común es de C (w₂) (w) b (i'')g es decir, templado subhúmedo, con verano largo y lluvia invernal. Su temperatura media varía de 10 a 12^o C y la precipitación de 700 a 900 mm (García, 1988).

Material genético

Se consideraron 39 cultivares de haba: 35 de éstas colectadas en los Municipios Mexiquenses de Acambay, Jocotitlán, Calimaya, Mexicaltzingo, Santa Cruz Atizapán, Santiago Tianguisitenco, Almoloya del Río, Toluca, Zinacantepec, Metepec, Lerma y San Felipe del Progreso, y cuatro variedades formadas por el Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX). En la Tabla 1 se muestra el código de identificación, el lugar de colecta, las características de las semillas, la altitud y las coordenadas geográficas donde fueron colectadas las 39 accesiones.

Diseño experimental y tamaño de la parcela

Los 39 cultivares se establecieron en campo en un diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones. La parcela constó de tres surcos de 4 x 0.80 m y el

surco central fue la parcela útil (3.20 m²).

Manejo agronómico

La preparación del terreno fue mecánica. La siembra se realizó el 20 de abril del 2013. La fertilización orgánica consistió en aplicar 2.5 t ha⁻¹ de estiércol de bovino. Se suministraron dos riegos de auxilio después de la siembra (7 de mayo y 7 de junio); se hicieron dos escardas (17 de mayo y 8 de junio) y el control de malezas fue manual. La cosecha se realizó después que el material genético alcanzó la madurez fisiológica.

Variables registradas

Se eligieron 10 plantas como unidad de muestreo en cada una de las unidades experimentales útiles y se registraron 27 variables: 16 cualitativas y 11 cuantitativas. Las variables cuantitativas fueron número de tallos (NT), número de nudos (NN), número de foliolos (NFo), porcentaje de floración (PF), número de flores por nudo (NFN), número de vainas por planta (NVP), peso de vaina (PVP, g), número de semillas por vaina (NSV), peso de 100 semillas (P100S, g). Se registró el peso de semilla por parcela experimental (PSP) y con éste se estimó el rendimiento de grano por hectárea (RHA). Las variables cualitativas registradas con la Guía Técnica del SNICS (2001) fueron: Hábito de Crecimiento (HC), Altura de Planta (AP), Coloración de Antocianinas del Follaje (CAF), Color del Follaje (CF), Longitud de la Flor (LF), Extensión de la Coloración de las Antocianinas en la Flor (ECAAF), Presencia de la Mancha de Melanina en el Ala (PMMA), Color de la Mancha de Melanina en el Ala (CMMA), Mancha de Melanina en el Estandarte (MME), Coloración de las

Antocianinas en el Estandarte (CAE), Porte de la Vaina (PV), Grado de Curvatura de la Vaina (GCV), Intensidad de Coloración Verde de la Vaina (ICVV), Forma de la Semilla (FS), Color de la Semilla (CS) y Presencia de Hilium(PH).

Análisis estadístico

Se hizo un análisis de varianza y sus cuadrados medios fueron empleados para calcular los componentes de varianza y la heredabilidad en sentido amplio (H^2), este último considerado como un estimador de la variabilidad genética existente entre cultivares (Pérez et al., 2007). También se hizo una comparación de medias entre cultivares con la prueba de Tukey ($\alpha=0.01$). Las medias aritméticas de cada cultivar para las 11 variables cuantitativas fueron utilizados para obtener una matriz de datos: los cultivares se asignaron a las hileras y los valores de cada variable a las columnas. Con esta matriz se obtuvieron los análisis de componentes principales (ACP; Sánchez, 1995) y de conglomerados (Método de la media aritmética no ponderada, UPGMA Method, por sus siglas en inglés). Ambos análisis se realizaron con el Sistema para Análisis Estadístico (Statistical Analysis System, SAS, 1988); la gráfica del *biplot* se hizo con Microsoft Excel 2010, usando las puntuaciones de los dos primeros componentes principales (Pérez et al., 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de varianza

En el presente estudio (Tabla 2) se observó que los efectos de los cultivares fueron altamente significativos ($P \leq 0.01$) en número de nudos (NN), porcentaje de floración (PF), número de flores por planta (NFP), número de vainas por planta (NVP), peso de vaina por planta (PVP), número de semillas por vaina (NSV), peso de 100 semillas (P100S), peso de semilla por parcela (PSP) y rendimiento por hectárea (RHA). Estos resultados son similares a los reportados por Yahia et al. (2012) y permiten deducir que para estas variables es posible la identificación de material genético sobresaliente. Los valores medios (Tabla 3) indican variabilidad para la mayoría de los caracteres evaluados, misma que puede ser explicada por la adaptación diferencial de los genotipos en el ambiente evaluado, tal como lo comentan Duc et al., (2010).

Componentes de varianza y heredabilidad

Los componentes de varianza (CV) se evalúan en términos de respuesta a la selección y el empleo del método de momentos, calculado con sus funciones lineales, permite estimar la variabilidad genética (H^2) que existe entre cultivares cuando se emplean los cuadrados medios del análisis de varianza (Shimelis y Shringani, 2010). En el presente estudio se observó que en la mayoría de los caracteres cuantitativos la H^2 varió de 30.7 a 99.80 % (Tabla 4). En caracteres cuantitativos, como el rendimiento de semilla, es deseable que los valores de H^2 sean superiores al 50 % (Filippeti y Ricciardi, 1988; Khare y Singh, 1991; Bakheit, 1992) para

contribuir a una mayor respuesta a la selección o para optimizar la asociación genotipo x ambiente. Sin embargo, estos resultados contrastan con los obtenidos por Alan y Geren (2007) quienes reportaron heredabilidades menores al 50 % en altura de planta (29%), número de tallos (17.6 %), vainas por planta (3%), semillas por vaina (47%) y peso de 100 semillas (30%).

Análisis de componentes principales

En el biplot que se construyó con los cultivares y las variables se observó que los componentes principales 1 (41.6%) y 2 (23.6 %) explicaron el 65.2 % de la variación total original (Figura 1). Sánchez (1995) y Perez et al. (2009) mencionaron que este porcentaje es deseable para interpretar confiablemente las correlaciones que existen entre ambos. La dispersión de los 39 cultivares en los cuatro cuadrantes del biplot sugiere que hay variabilidad genética que está disponible para iniciar un nuevo programa de mejoramiento. La variabilidad fenotípica que se detectó en las 39 colectas de haba fue mayor en NN, PF, NFP, NVP, PVP, P100S, PSP y RHA. La colecta 8 (T8), proveniente de Tixmadejo, Municipio de Acambay, mostró un rendimiento de 4.16 t ha⁻¹ valor mayor al promedio nacional que es de 0.99 t ha⁻¹. T8 también mostró superioridad en número de nudos (11.76), porcentaje de floración (90%) y peso de vaina por planta (152.83 g), seguido P5 (Pueblo Nuevo) de Acambay y P27 (Santa Cruz Cuahutenco) de Zinacantepec (Tabla3). Estos resultados son similares a los observados por Neal y Mcvetty (1983) quienes concluyeron que de 68.5 a 76.4 % de la variabilidad en el rendimiento de semilla se debe al número de vainas producidas por planta (Singh et al., 1987; De Costa et al., 1997; Chaieb et al., 2011), a semillas por vaina

(Alan y Geren, 2007), al peso de 100 semillas (Baginsky et al., 2013) y al tamaño de la semilla (Al-Refaee et al., 2004). En este contexto se sugiere construir un índice de selección que considere estos caracteres para formar nuevos cultivares con mayor rendimiento. Mohammed *et al.* (2013) concluyeron que el número de vainas y la eficiencia de la hoja también pueden usarse como criterio de selección indirecta para aumentar la productividad en esta leguminosa.

Aunque el número de vainas por planta ha sido considerado por muchos autores como la principal fuente de variación en el rendimiento del cultivo de haba (en condiciones muy favorables se llega a producir un exceso de vainas y también de abortos), el número de semillas por metro cuadrado (dependiendo del número de vainas) es el factor que más afecta al rendimiento.

Análisis de conglomerados

En el dendograma de la Figura 2, al cortar a una distancia promedio entre conglomerados de 0.8, se identificaron cuatro grupos: en el grupo IV sólo se identificó al cultivar 24, proveniente de Santiago Tianguistenco, que registró valores significativos en NN, NFo, NFP y el P100S que fue el más alto con respecto a todas las poblaciones, por lo que registró un RHA de 3.53; estos resultados son similares a los encontrados por (Alan y Geren, (2007) y (Baginsky et al., (2013) quienes comentan que estos caracteres influyen de manera importante en el rendimiento; en el grupo II fueron comunes los cultivares identificados como T7 y T29 de Los Reyes, Jocotitlán y la variedad San Isidro de Metepec, respectivamente,

ambos materiales mostraron características deseables en cuanto a NT, N_{Fo}, PVP, y un rendimiento experimental por arriba de las tres toneladas; el grupo I quedó conformado por T1, T32, T9, T36, T5, T8, T2, T27, T4, T30, T3, T26, T31, T17, T20 y T25, las primeras 13 pertenecen a la parte norte y centro del Valle Toluca-Atlacomulco, las tres últimas a la zona sur este; en términos de los caracteres agronómicos evaluados es el grupo más importante porque aglomera a las mejores poblaciones. En contraste, en el grupo III se clasificaron el resto de los cultivares con los valores medios más bajos. Tales resultados coinciden con Duc et al., (2010), quienes comentan que la respuesta de los genotipos es diferencial, ya que la adaptación al ambiente y su interacción con éste es determinante en una expresión fenotípica deseable.

Caracteres cualitativos

La identificación de variabilidad genética entre y dentro de cultivares permite seleccionar variedades con características agronómicas deseables y contribuye al aumento parcial de la producción y de la calidad de la semilla de haba. La descripción varietal permite una discriminación fácil y rápida entre fenotipos (Franco e Hidalgo, 2003) generalmente son consideradas características altamente heredables, fácilmente detectadas a simple vista y con poca o nula variación a través de los ambientes. Además, pueden incluir un número limitado de caracteres adicionales que son deseables según el consenso de los usuarios de un cultivo en particular (Pérez et al., 2007). En el presente trabajo no se observaron diferencias fenotípicas en las 39 poblaciones en hábito de crecimiento (HC) determinado (D) y color verde grisáceo, excepto T29 (San Isidro) que fue verde y T35 que fue verde azulado; 12 cultivares presentaron

coloración de antocianinas en el follaje.; la extensión de la coloración de las antocianinas fue grande sólo en T8, en 23 poblaciones fue mediana y en 15 pequeña; la presencia de mancha de melanina la registraron todas las poblaciones, el color de la mancha fue café, hubo presencia de mancha de melanina pero con ausencia de coloración (Tablas 5 y 6).

El porte de la vaina fue semierecto en 26 poblaciones, erecto en ocho y horizontal en cinco, ésta es importante para los productores ya que un ángulo erecto de la vaina favorece la madurez fisiológica, la cosecha mecanizada y la resistencia y/o tolerancia a la sequía (Gresta et al., 2009); no hubo grado de curvatura en 24 poblaciones, dos fueron de curvatura media y 13 débil; la intensidad del color verde de la vaina fue media en 20 poblaciones, débil en 13 y fuerte en seis. La forma de la semilla fue ovada en 21 poblaciones, oblonga en 15, elíptica en dos y solo en T29 fue rectangular; el color de la semilla fue café claro en todas las poblaciones excepto en T30 que fue jaspeado; todos los materiales presentaron *hilium*(Tabla7). Los caracteres morfológicos de tipo cualitativo, como hábito de crecimiento, altura de planta, color del follaje y presencia de flores, entre otros, son los que permiten la identificación visual de los genotipos en campo; así una mayor o menor uniformidad y adaptación de los genotipos influirá en su uso final por parte de los productores (Madriz y Luciani, 2002).

CONCLUSIONES

Los análisis de componentes principales y de conglomerados permitieron identificar a los cultivares 8,5 y 27 como superiores en rendimiento de semilla. También se observó amplia variabilidad fenotípica en NN, PF, NFP, NVP, PVP, P100S, PSP (Valores de H^2 de 75 a 99.8 %).

REFERENCIAS

- Alan, O., y Geren H.2007. Evaluation of heritability and correlation for seed yield and yield components in faba bean (*Vicia faba*L.). *Journal of Agronomy* 6 (3): 484-487.
- Al-Reface, M., Turk, M., and Tawaha A. 2004. Effect of seed size and plant population density of yield and yield components of local faba bean (*Vicia faba*L. Mayor). *International Journal of Agriculture and Biology* 2:294-299.
- Arbaoui, M., Link, W., Satovi,Z.,Torres, A. M. 2008. Quantitative trait loci of frost tolerance and physiologically related trait in faba bean (*Vicia faba* L.) *Euphytica*. 164(1): 93-104.
- Baginsky, C., Silva P., Auza J., and E. Acevedo. 2013. Evaluation for fresh consumption of new broad bean genotypes with a determinate growth habit in central Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research* 73 (3):225-232.
- Bakheit, B. R. 1992. Shambat 104. A new faba bean cultivar for the Gezira, Sudan. *FABIS Newsletter* 30:20-22.
- Cordeiro, G.M., Pan, Y.B., Henry, R.J. 2003.Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. *Plant Science* 165 (1):181-189.
- Chaieb, N., Mohamed B., Mars M. 2011. Growth and yield parameters variability among faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes. *Journal of Natural Products Plant Resources*1 (2): 81-90.

- De Costa, W. A. J. M., Dennet M. D., Ratnaweera U., and Nyalemegbe K. 1997. Effects of different water regimes on field –grown determinate and indeterminate faba bean (*Vicia faba* L.). II. Yield, yield components and harvest index. *Field Crops Research* 52:169-178.
- Díaz, B. M., B. E. Herrera C., J. Ramírez J., M. Aliphath F., A. Delgado A. 2008. Conocimiento campesino en la selección de variedades de haba (*Vicia faba* L.) en la sierra norte de Puebla, México. *Interciencia* 33 (8): 610- 615.
- Duc, G., Bao S.Y., Baum, M., Redden.B., Sadiki, M., Suso, M.J., Vishniakova, M., and Zong X.X. 2010. Diversity maintenance and use of *Viciafabab* L. genetic resources. *Field Crops Research* 115:270-278.
- Filippetti, A., and Ricciardi L.1988. Development of new determinate growth habit in *Viciafabab* L. Mayor. Analysis of cross between determinate mutant and autofertile line. *Genet.Agr.* 42: 299-316.
- Franco, L. T., e Hidalgo R. 2003. Análisis estadístico de caracterización morfológica de recursos filogenéticos. Boletín técnico No.8, Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto Nacional de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 246 pp.

Gresta F., Avola G., Albertini E., Raggi L., Abbate V. 2009. A study of variability in the Sicilian faba bean landrace “Larga di Leonforte”. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 57 (4): 523-531.

Instituto de Información e Investigación Geográfica, Estadística y Catastral del Estado de México (IGECEM). 2011. Gobierno del Estado de México. Disponible en línea en: portal2.edomex.gob.mx/igecem/productosy.../index.htm. Fecha de consulta: 19 agosto, 2013.

Khare, D., and C.B. Singh. 1991. Genetic behavior of yield and quality traits of *Vicia faba* L. *New Phytologist* 72: 1293.

Li-juan, L., Zhao-hai, Y., Zhao-jie, Z., Ming-shi, X., Han-qing, Y. 1993. Study and utilization of faba bean germplasm resources. In: Saxena, M.C., Weigand, S., Li-juan, L. (Eds), *Faba Bean in China: State-of-the Art Review*. ICARDA Press, (Ch. 4), pp 51-63.

Madriz, I.P.M., y Luciani, M.J.F. 2002. Caracterización morfológica de 20 genotipos de frijol mungo (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela*. 28 (1): 27-39.

Mohammed, O. A. A., A.A. Hamid A.A., and M. Bakheit G. 2013. Correlation between seed yield components in Faba bean (*Vicia faba* L.). *Advances in Environmental Biology* 7 (1):82-85.

Neal, J. R. and P. B. E. Mcvetty. 1983. Yield structure of faba bean (*Vicia faba* L.) grown in Manitoba. *Field Crops Research* 8:349-360.

- Orozco, C. N., D. J. Pérez L., A. González H., O. Franco M., F. Gutiérrez R., M. Rubí A., A. Castañeda V., y A. Balbuena M. 2013. Identificación de poblaciones sobresalientes de haba colectadas en el Estado de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4(6): 921-932.
- Pearce S.R., Harrison G., Li D., Heslop-Harrison J.S., Kumar A., Flavell A. 2000. The Ty1-copia group retrotransposon in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosome localization. *Molecular Genetics and Genomics* 250: 305-315.
- Pérez, L. D. J., L. M. Vásquez, G., J. Sahagún, C., A. Rivera, P. 2007. Variabilidad y caracterización de diez variedades de papa en tres localidades del estado de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 13(1):13-19.
- Pérez, D.J., A. González, J. Sahagún, L. M. Vásquez G., Antonio Rivera, O. Franco, and A. Domínguez. 2009. The identification of outstanding potato cultivars using multivariate methods. *Ciencia e Investigación Agraria (Journal of Agriculture and Natural Resources)* 36(3):391-400.
- Robertson, L.D., El-Sherbeen and, M. 1991. Distribution of discretely scored descriptors in a pure line faba bean (*Vicia faba* L.) germplasm collection. *Euphytica*(57) 83-92.
- Rojas, T. J., R. Díaz R., F. Álvarez G., J. Ocampo M., y A. Escalante E. 2012. Tecnología de producción de haba y características socioeconómicas de productores en Puebla y Tlaxcala. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3 (1): 35-49.

- Sánchez, G. J. J. 1995. El análisis biplot en clasificación. *Revista Fitotecnia Mexicana* 18:188-203.
- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). 2001. Guía Técnica para la Descripción Varietal de Haba (*Vicia faba* L.). 12 p. Disponible en línea en: www.sagarpa.gob.mx/snics/haba.3.doc.2002. Fecha de consulta: 10 de septiembre de 2011.
- Shimelis, H., and R. Shiringani. 2010. Variance components and heritabilities of yield and agronomic traits among cowpea genotypes. *Euphytica* 176:385-389.
- Singh, S. P., N. P. Singh, and R.K. Pandey. 1987. Irrigation studies in faba bean. *FabisNewsletter* 18: 24-26.
- Statistical Analysis System (SAS). 1988. SAS/STAT User's Guide-Release 6.03 edition Cary, N. C. SAS Institute Inc. 1028 p.
- Suso, M. J., M. T. Moreno, and J. I. Cubero. 1993. New isozyme markers in *Vicia faba*: inheritance and linkage. *Plant Breeding* 40:105-111.
- Terzopoulos, P., Kaltsikes P., y Bebeli P. 2003. Collection, evaluation and classification of Greek populations of faba bean (*Vicia faba* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution* 50:373-381.
- Yahia, Y., A. Guetat, W. Elfalleh, A. FeRchichi, H. Yahia, and M. Loumerem. 2012. Analysis of agromorphological diversity of southern Tunisia faba bean (*Vicia faba* L.) germplasm. *African Journal of Biotechnology* 11 (56): 11913-11924.

Tabla 1. Código de identificación, características de las semillas, sitios de colecta, altitud y coordenadas geográficas de las 39 accesiones evaluadas.

| Código de identificación | Tamaño y color de semilla en seco | Lugar de Colecta | Altitud (msnm) | Coordenadas geográficas |
|---|--|-------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| T1, T2, T3, T4, T5, T6, T8, T9 | Pequeño, testa amarilla | Acambay | 2440 | 19° 57' 16'' N 99° 50' 39'' O |
| T7 | | Jocotitlán | 2200-3400 | 19° 42' 26'' N 99° 47' 12'' O |
| T10, T11, T12, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19, T34 | Grande, testa amarilla | Calimaya | 2690 | 19°10' 25'' N 99°37' 02'' O |
| T20 | Grande, testa amarilla | Mexicaltzingo | 2600 | 19° 13' 15'' N 99° 33' 05'' O |
| T23 | Grande, testa amarilla | Santa Cruz Atizapán | 2600 | 19° 09' 27'' N 99° 29' 19'' N |
| T21, T22, T24, T25, T37 | Grande, testa amarilla | Santiago Tianguistenco | 2622 | 19° 10' 08'' N 99° 28' 01'' O |
| T26, T33, T35 | Mediano, testa amarilla a café claro | Toluca | 2680 | 19° 17' 32'' N 99° 39' 14'' O |
| T27 | Mediano, testa amarilla a café claro | Zinacantepec | 1160 | 19°17' 00'' N 99° 44' 00'' O |
| T28 | Grande, testa amarilla | Almoloya del Rio | 2610 | 19°10' 00'' N 99° 29' 00'' O |
| T29*, T30**, T31, T32, T39 | Pequeño a mediano, testa ligeramente café a café* y jaspeada** | Metepec | 2635 | 19° 15' 04'' N 99° 36' 17'' O |
| T36 | Mediano, testa amarilla a café claro | Lerma | 2570 | 19° 17' 05'' N 99° 30' 43'' O |
| T38 | Pequeño, testa amarilla a café claro | San Felipe del Progreso | 2570-2650 | 19° 57' 16'' N 99° 50' 39'' O |

Fuente: (IGECEM, 2011)

Tabla 4. Componentes de varianza y heredabilidad en sentido amplio (H^2) en 11 variables cuantitativas evaluadas en 39 cultivares de haba.

| Variable | σ_G^2 | σ_f^2 | H^2 (%) |
|----------|--------------|--------------|-----------|
| NT | 0.32 | 0.79 | 40.5 |
| NN | 2.33 | 2.72 | 85.6 |
| NFo | 0.016 | 0.052 | 30.7 |
| PFP | 53.36 | 61.19 | 87.2 |
| NFN | 0.15 | 0.20 | 75.0 |
| NVP | 115.40 | 115.73 | 99.7 |
| PVP | 1769.9 | 1775.3 | 99.6 |
| NSV | 0.061 | 0.07 | 87.1 |
| P100S | 1509.7 | 1618.9 | 93.2 |
| PSP | 1422.18 | 1424.81 | 99.8 |
| RHA | 125.0 | 128.0 | 97.6 |

Número de tallos (NT), número de nudos (NN), número de foliolos (NFo), porcentaje de floración (PF), número de flores (NFP), número de vainas por planta (NVP), peso de vaina por planta (PVP), número de semillas por vaina (NSV), peso de 100 semillas (P100S), peso de semillas por parcela (PSP), y rendimiento de grano por hectárea (RHA).

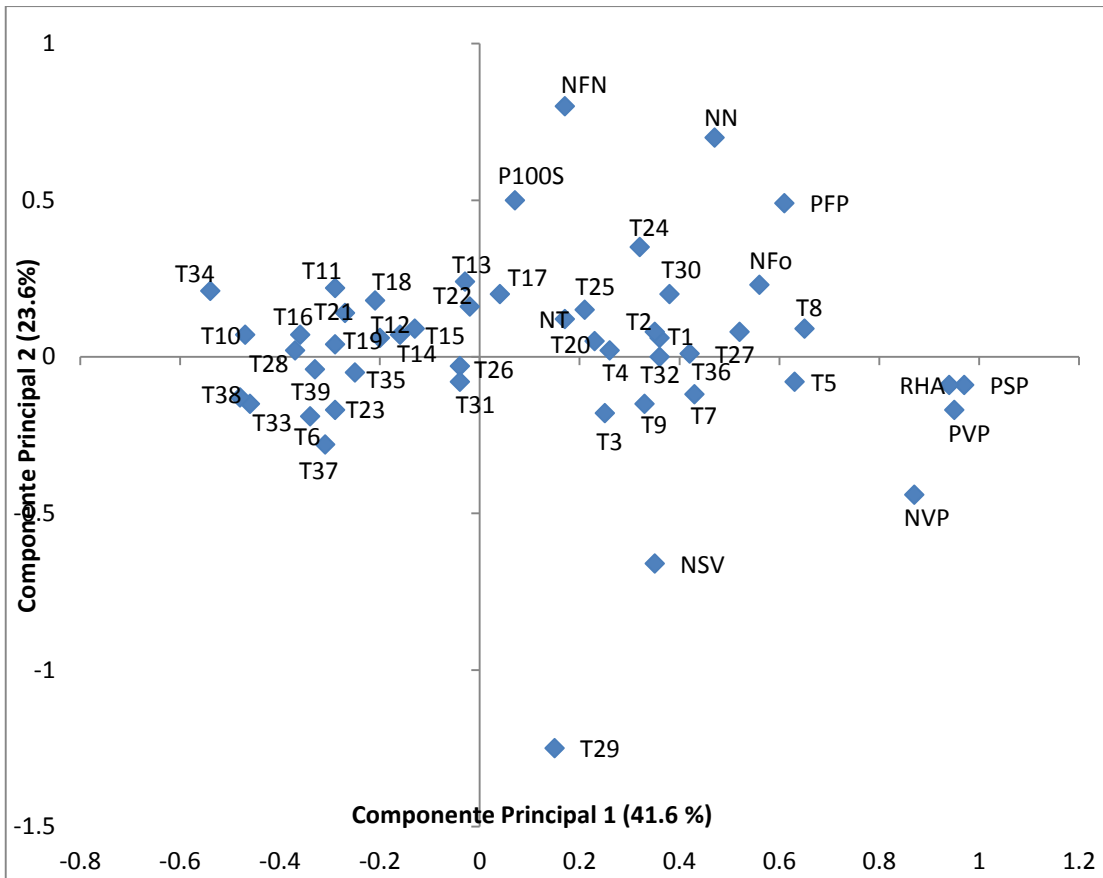


Figura 1. Interrelaciones entre 39 cultivares de haba (en número) y 11 variables agronómicas (en letra).

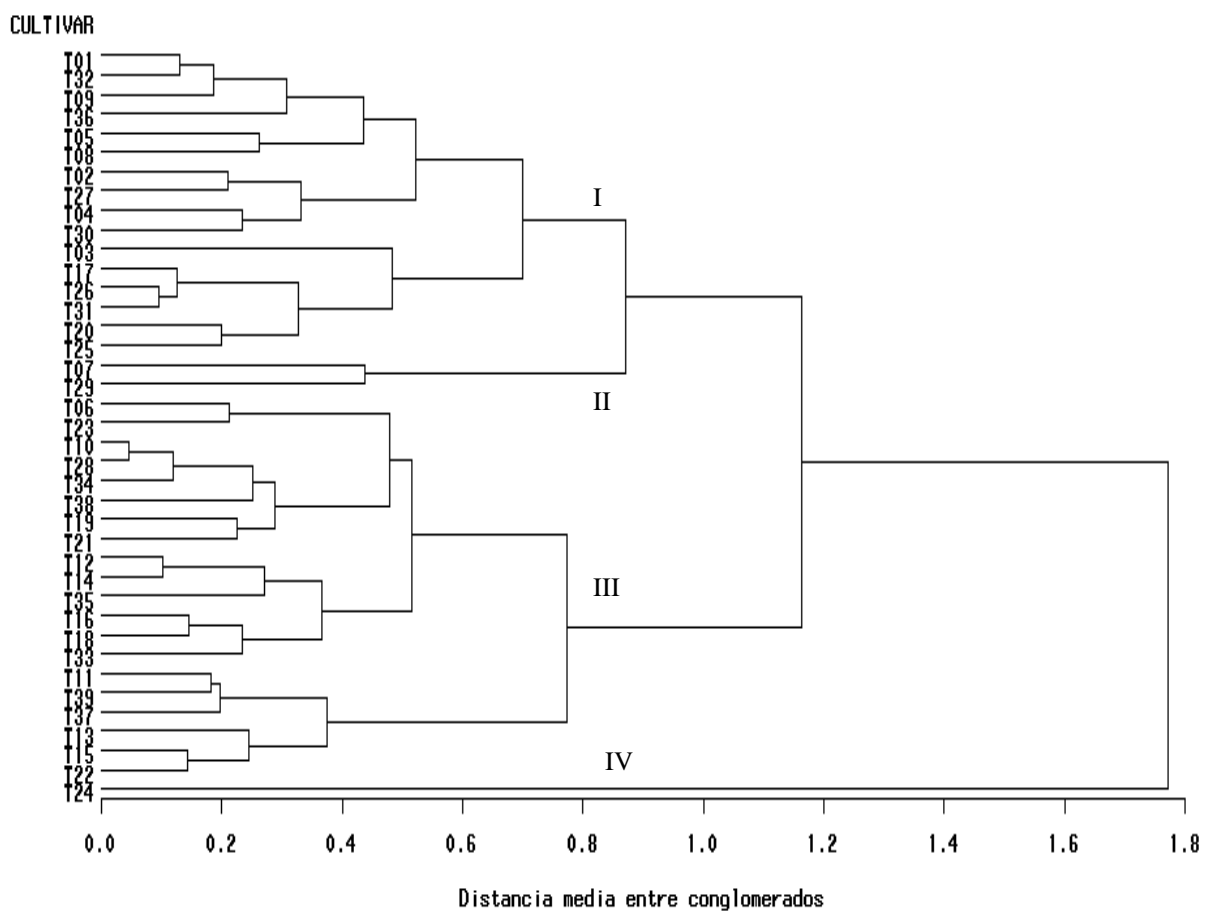


Figura 2. Agrupación de 39 cultivares de haba con base en 11 variables agronómicas. Método de agrupamiento de pares no ponderados con medias aritméticas (Método UPGMA).

V. CONCLUSIONES GENERALES

- Fue posible analizar la variabilidad genética entre las 39 accesiones mediante la caracterización molecular y agromorfológica, detectándose dos poblaciones molecularmente diferentes, P29 y P25; y encontrándose diferencias fenotípicas de planta y semilla en P29 y P30.
- Los marcadores moleculares ISSR fueron eficientes para caracterizar las accesiones, ya que permitieron detectar seis grupos bien definidos, lo cual permitió hacer inferencias sobre su origen, adaptación y explicar la movilidad de los materiales.
- Los análisis moleculares permitieron detectar que las accesiones evaluadas poseen algunas secuencias génicas diferentes a las identificadas en accesiones de otras latitudes.
- Los marcadores morfológicos permitieron corroborar la variabilidad detectada a nivel molecular.
- Los análisis de componentes principales y de conglomerados permitieron identificar a los cultivares 8, 5 y 27 como superiores en rendimiento de semilla. También se observó amplia variabilidad fenotípica en NN, PF, NFP, NVP, PVP, P100S, PSP .
- La combinación de la caracterización molecular y morfológica permitió detectar materiales promisorios en cuanto a caracteres asociados al rendimiento que pueden ser utilizados en programas de mejoramiento genético, encaminados a resolver las necesidades específicas de los productores.

VI. LITERATURA COMPLEMENTARIA

Crepón, K., Marget P., Peeyronnet C., Carrouée B., Arese P., Duc G. **2010**. Nutritional value of faba bean (*Vicia faba* L.) seed for feed and food. *Field Crops Research* 115: 329-339.

Cubero, J.I. **1974**. On the evolution of *Vicia faba* L. *Theoretical Applied Genetics* 45 (2):47-51.

Doyle, J.J., and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.

INIFAP. **2013**. Potencial productivo de especies agrícolas de importancia socioeconómica en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). ISBN: 978-607-425-766-3. INIFAP, Campo Experimental, Toluca, México.

Díaz-Ruíz, R., Delgado-Alvarado A., Herrera-Cabrera B. E., Sandoval-Castro E. **2006**. Germplasm of faba bean (*Vicia faba* L.) in México. In: International Workshop on faba bean breeding and agronomy. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Junta de Andalucía, Córdoba, España. 188-190 pp.

Ellwood, S., Phan H., Jordan M., Hane J., Torres A., Ávila C., Cruz-Izquierdo S., Oliver R. **2008**. Construction of a comparative genetic map in faba bean (*Vicia faba* L.); conservation of genome structure with *Lens culinaris*. *BMC Genom* 9(1):380.

FAOSTAT. **2013**. Base de datos estadísticos de la FAO. (disponible en línea). <http://www.faostat.fao.org/.site/567>. Fecha de consulta: Noviembre de 2013.

Flores, F., Nadal S., Solis I., Winkler J., Sass O., Stoddard F.L., Link W., Raffiot B., Muel F. and Rubiales D. **2012**. Faba bean adaptation to autumn sowing under European climates. *Agronomy for Sustainable Development* 32 (3):727-734.

Kalia, P., and Sood, S. **2004**. Genetic variation association analyses for pod yield and other agronomic and quality characters in and Indian Himalayan collection of broad bean (*Vicia faba* L.). *J. Breed. Genet.* 36(2):55-61.

Lawes, D.A., Bond D.A., and Poulsen M.H.**1983**. Classification, Origin, Breeding Methods and Objectives, In: *Faba bean (Vicia faba L.), A basis for improvement*, (Ed.): P.D. Hebblethwaite. Butterworths, London.

Li-Juan, L., Zhao-hai Y., Zhou-jie Z., Ming-shi X., and Han-qing Y. **1993**. Faba bean in China: State-of-the-art review. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas Aleppo, Syria.

Mohammed, O. A. A., Osman, T. Y. S., Awok, O. **2010**. Performance of faba beans (*Vicia faba* L.) cultivars grown in new agro-ecological region of Sudan (Southern Sudan). *Australian J. Basic Appl. Sci.* 4(11):5516-5521.

Nadal, S., Moreno M.T., y Cubero J. I. **2004**. Haba (*Vicia faba* L.). pp. 211-229 In: *Las leguminosas de grano en la agricultura moderna*. Ediciones Mundi Prensa, Barcelona, España, 318 p.

Ortíz, C., Solorzano V.E., y Mendoza O.L.E. **1983**. Comportamiento de caracteres agronómicos y fisiotécnicos de diez colecciones de haba (*Vicia faba* L.) bajo diferentes condiciones ambientales. *Agrociencia* 55:101-114.

Pearce, S., Knox M., Ellis T., Flavell A., and A Kumar. **2000**. Pea Tyl- copia group retrotransposons: transpositional activity and use as markers to study genetic diversity in *Pisum*. *Molecular Genetics and Genomics* 263 (6):898-907.

Pérez, L.D. de J., y González, H. A. **2003**. Cultivo y mejoramiento de haba. 1ª. Edición. Colección de Ciencias Agropecuarias, Serie: Agronomía. Universidad Autónoma del Estado de México. 101 p.

SIAP. **2009**. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Producción Agrícola por Estados. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

Stewart, C., and L. Via. **1993**. A rapid CTAB ADN isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR Applications *Biotechniques* 14: 748–749.

Yujiao, L., and Wanwei H. **2010**. Genetic diversity of Faba bean germplasm in Quinghai and core germplasm identified based on AFLP analysis. *Legume Genomics and Genetics*. Vol. 1. 1:1-6.

Zeid, M., SchonC.C., and Link, W. **2003**. Genetic diversity in recent elite faba bean lines using AFLP markers. *Theoretical Applied Genetics* 107 (7): 1304-1314.

LISTA DE TABLAS ANEXAS

Tabla 1. Lecturas de absorbancia y concentración de ADN determinada.

| LECTURAS DE ABSORBANCIA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DNA | | | | |
|--|--|---|--------------------------------|---|
| MUESTRA | LONGITUD DE ONDA λ 260 | [DNA]μg/μL | DNA (μL) | AGUA GRADO MOLECULAR (μL) |
| 1 | 0.141 | 0.705 | 7.09 | 492.91 |
| 2 | 0.174 | 0.870 | 5.74 | 494.26 |
| 3 | 0.101 | 0.505 | 9.90 | 490.10 |
| 4 | 0.078 | 0.390 | 12.82 | 487.18 |
| 5 | 0.184 | 0.920 | 5.43 | 494.57 |
| 6 | 0.128 | 0.640 | 7.81 | 492.19 |
| 7 | 0.160 | 0.800 | 6.25 | 493.75 |
| 8 | 0.117 | 0.585 | 8.54 | 491.46 |
| 9 | 0.091 | 0.455 | 10.98 | 489.02 |
| 10 | 0.171 | 0.885 | 5.84 | 494.16 |
| 11 | 0.143 | 0.715 | 6.99 | 493.01 |
| 12 | 0.077 | 0.385 | 12.98 | 487.02 |
| 13 | 0.095 | 0.475 | 10.52 | 489.48 |
| 14 | 0.143 | 0.715 | 6.99 | 493.01 |
| 15 | 0.135 | 0.675 | 7.40 | 492.6 |
| 16 | 0.152 | 0.760 | 6.57 | 493.43 |
| 17 | 0.181 | 0.905 | 5.52 | 494.48 |
| 18 | 0.162 | 0.810 | 6.17 | 493.83 |
| 19 | 0.146 | 0.730 | 6.84 | 493.16 |
| 20 | 0.199 | 0.995 | 5.02 | 494.98 |
| 21 | 0.200 | 1.00 | 5.00 | 495.00 |
| 22 | 0.161 | 0.805 | 6.21 | 493.79 |
| 23 | 0.174 | 0.870 | 5.74 | 494.26 |
| 24 | 0.150 | 0.750 | 6.66 | 493.34 |
| 25 | 0.140 | 0.700 | 7.14 | 492.86 |
| 26 | 0.101 | 0.505 | 9.90 | 490.10 |
| 27 | 0.166 | 0.830 | 6.02 | 493.98 |
| 28 | 0.214 | 1.07 | 4.67 | 495.33 |
| 29 | 0.163 | 0.815 | 6.13 | 493.87 |
| 30 | 0.154 | 0.770 | 6.49 | 493.51 |
| 31 | 0.188 | 0.940 | 5.31 | 494.69 |
| 32 | 0.247 | 1.235 | 4.04 | 495.96 |
| 33 | 0.224 | 1.120 | 4.46 | 495.54 |
| 34 | 0.213 | 1.065 | 4.69 | 495.31 |
| 35 | 0.201 | 1.005 | 4.97 | 495.03 |
| 36 | 0.204 | 1.020 | 4.90 | 495.10 |
| 37 | 0.302 | 1.510 | 3.31 | 496.69 |
| 38 | 0.189 | 0.945 | 5.29 | 494.71 |
| 39 | 0.219 | 1.095 | 4.56 | 495.44 |

Tabla 2. Componentes y concentraciones para preparar 25 μL de mezcla de reacción.

| Componentes | [Stock] | [Final] | 1X (μL) | 41 X (μL) |
|----------------------|--------------------------------|-------------------|--------------------------------------|--|
| Agua | | | 5.2 | 213.2 |
| dNTPs | 500 μM | 200 μM | 10 | 410 |
| Amortiguador | 10X | 1X | 2.5 | 102.5 |
| MgCl ₂ | 50mM | 3 mM | 1.5 | 61.5 |
| Primer y/o iniciador | 10 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ | 30 ng | 3.0 | 123 |
| Enzima | 5 $\text{U}\mu\text{L}^{-1}$ | 1.5 U | 0.3 | 12.3 |
| ADN | | | 2.5 | |
| Total | | | 25 | |

El cálculo de las concentraciones finales de los reactivos utilizados en el protocolo de la caracterización molecular se calcularon a partir de soluciones concentradas, utilizando la fórmula $C_1 V_1 = C_2 V_2$.

Donde:

C1 = concentración 1

V1 = Volumen 1

C2 = Concentración 2

V2 = Volumen 2