



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS GRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

**POSTGRADO DE
ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL**

**CONTENIDO DE TANINOS Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
DE VARIEDADES DE HABA (*Vicia faba* L.) CULTIVADAS POR
AGRICULTORES**

Bladimir Jordan Aguilar

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS

**Puebla, Puebla
2011**



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS-POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

CAMPUS-622-ALAMIZO

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Bladimir Jordan Aguilar** alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor Dr. Ramón Díaz Ruiz por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis *Contenido de taninos y caracterización molecular de variedades de haba (*Vicia faba* L.) cultivadas por agricultores* y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla 31 de enero del 2011.

Firma

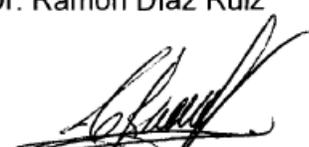
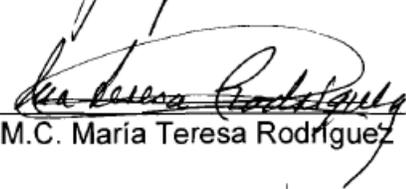
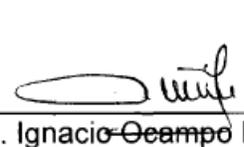
Vc. Bc. Profesor Consejero o Director de Tesis

La presente tesis intitulada: **Contenido de taninos y caracterización molecular de variedades de haba (*Vicia faba* L.) cultivadas por agricultores**; realizada por el alumno: **Bladimir Jordan Aguilar**; bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

| | |
|-----------|--|
| Consejero |  _____ Dr. Ramón Díaz Ruiz |
| Asesora |  _____ Dra. Carmen Jacinto Hernández |
| Asesora |  _____ M.C. María Teresa Rodríguez |
| Asesor |  _____ Dr. Ignacio Ocampo Fletes |

Puebla, Puebla, México 14 de Febrero de 2011

CONTENIDO DE TANINOS Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VARIEDADES DE HABA (*Vicia faba* L.) CULTIVADAS POR AGRICULTORES

RESUMEN

En México el haba (*Vicia faba* L.) es importante para la alimentación de los habitantes del medio rural y urbano, contiene un alto contenido nutritivo, es un alimento balanceado, asimismo en la actualidad los productores demandan variedades con mayor calidad de semilla. El rango en cuanto al contenido de taninos en las semillas de haba cultivadas por los agricultores fue determinado, se estimaron las relaciones entre las variedades de haba mediante la utilización de marcadores moleculares tipo RAPD y microsatélites y se propone una estrategia de aprovechamiento de las variedades por los productores de haba con base a los caracteres estudiados. El desarrollo de este estudio se realizó en dos etapas, la primera consistió en la determinación del contenido de taninos en 60 genotipos de haba y la segunda fue la caracterización molecular del mismo material genético de haba con la ayuda de marcadores RAPD e ISSR. Las variedades de haba que se utilizaron fueron colectadas en las regiones productoras de la especie pertenecientes a los estados de Puebla, Tlaxcala, Oaxaca y Guerrero. La cuantificación de taninos se efectuó con el método de Burns (1971), modificado por Maxon y Rooney (1972) y por Price *et al.* (1978). En la caracterización molecular se probaron 34 iniciadores RAPD y 10 microsatélites en los 60 genotipos de haba, de los cuales 16 RAPD amplificaron y solamente seis de ellos se seleccionaron por presentar polimorfismo (OPA-14, OPAC-20, OPH-12, OPM-05, OPN-13 y OPF-13), los iniciadores elegidos amplificaron un total de 24 bandas, de las cuales 16 fueron polimórficas, esto representa un 66.6% de polimorfismo, en el caso de los microsatélites se evaluaron 10, los cuales amplificaron pero no presentaron polimorfismo, por lo que no se incluyeron en el análisis de diversidad. Existen diferencias significativas en cuanto al contenido de taninos de las variedades de haba, el rango obtenido fue de 2.6% a 11.2%, y las variedades con menor y mayor contenido de dicho compuesto anti nutritivo fueron las señaladas como V44 y V72 respectivamente. Con los marcadores RAPDs se encontró variabilidad a nivel molecular entre las poblaciones de haba, en las que se definieron en total 9 grupos con diferente número de variedades cada uno donde destacan 4 grupos integrados por una variedad, identificadas como V1, V8, V33 y V70, con base a lo anterior, se plantean algunas líneas estratégicas enfocadas en la preservación y producción de haba, a partir del conocimiento campesino y del conocimiento generado en la presente investigación.

Palabras clave: Taninos, caracterización molecular, variedades de haba, líneas estratégicas.

TANNIN CONTENT AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF FABA BEAN VARIETY (*Vicia faba* L.) GROWN BY FARMERS

ABSTRACT

In Mexico, faba bean (*Vicia faba* L.) is important in the diet of people in rural and urban areas, it has a high nutritional content, it's a balanced food. Currently the producers demand a higher quality varieties of seed. The range for the content of tannins in faba bean grown by farmers was determined, we estimated the relationships between faba bean varieties using RAPD and microsatellites and proposed a strategy for the use of varieties faba bean producers based on characters studied. The development of this study was conducted in two stages: the first consisted of determining the tannin content in 60 genotypes of faba bean and the second was the molecular characterization of the genetic material of faba bean, with the help of RAPD and ISSR markers, the faba bean varieties used were collected from the producing regions of the species belonging to the states of Puebla, Tlaxcala, Oaxaca and Guerrero. The quantification of tannins was performed using the method of Burns (1971), as amended by Maxon and Rooney (1972) and Price *et al.* (1978). In the molecular characterization RAPD primers were tested 34 and 10 microsatellites in the 60 faba bean genotypes, of which 16 RAPD amplified and only six of them were selected by presenting polymorphism (OPA-14, OPAC-20, OPH-12, OPM- 05, OPN-13 and OPF-13), the selected primers amplified a total of 24 bands, of which 16 were polymorphic, this represents a 66.6% polymorphism, in the case of microsatellites 10 were assessed, which amplified but didn't show polymorphism, so were not included in the analysis of diversity. There are significant differences in the tannin content of faba bean varieties, the range observed was 2.6% to 11.2%, and the varieties with lower and higher in the anti-nutritional compound were identified as V-44 and V-72 respectively. With RAPD markers found at the molecular variability among populations of faba bean, which defined a total of 9 groups with different number of varieties, each the stand 4 groups with a variety, identified as V1, V8, V33 and V70 based above, we propose some strategic focus on the preservation and production of faba beans, considering rural knowledge and knowledge generated in this investigation.

Keywords: Tannin, molecular characterization, varieties of faba bean, strategy lines.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento que me brindó para realizar mis estudios en el Colegio de Postgraduados, que sin su apoyo no hubiera podido cursar el postgrado.

Mis más sinceros agradecimientos al Colegio de Postgraduados y en especial al *Campus* Puebla, por darme la oportunidad para realizar mis estudios.

A la Línea 6 Conservación y Mejoramiento de los Recursos Genéticos por su apoyo a la presente investigación.

A los integrantes de mi consejo particular:

Les agradezco la confianza que me brindaron y la paciencia que me tuvieron durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Ramón Díaz Ruiz, un especial agradecimiento por su apoyo, tiempo, compromiso y paciencia, por sus valiosos conocimientos y consejos que fueron claves durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Carmen Jacinto Hernández, por dirigir pacientemente el trabajo de laboratorio y por su invaluable amistad, y por sus consejos durante la realización de esta investigación.

A la Mtra. María Teresa Rodríguez González, por sus consejos y sugerencias para mejorar esta investigación y por dirigir pacientemente el trabajo de laboratorio.

Al Dr. Ignacio Ocampo Fletes, por sus consejos, su apoyo y asesoría otorgada durante la realización de esta investigación.

A los Profesores del *Campus* Puebla por compartir sus conocimientos y experiencias que me fueron de valiosa ayuda para la culminación de esta investigación.

DEDICATORIA

A DIOS

Al divino Creador “DIOS” todo poderoso, pues con su guía y amor pude llevar a cabo este nuevo reto en mi vida. Sin su ayuda nada es posible.

A mi ESPOSA Sirlene

A quien le agradezco su acompañamiento en esta parte de la vida y por haberme apoyado incondicionalmente en mi formación académica

A mis HIJOS Dana Paulette, Jorge Biali, Vladimir y Paulino Alexander.

A quien le agradezco sus sonrisas y por enseñarme que la vida es para disfrutarla y ser mi motivo de superación.

A mis PADRES

Paulino y Felipa. A quienes les debo la vida, gracias por haberme apoyado y darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente y por el apoyo moral y económico que he recibido incondicionalmente.

A mis HERMANOS

Uriel, Yazmin, Jorge, Nancy, y Carmen, les agradezco su apoyo moral y su ayuda en los momentos más difíciles y por darme la oportunidad de haber crecido juntos por haber compartido los momentos más felices y difíciles de mi vida.

INDICE

| | |
|---|----|
| CAPITULO I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPITULO II. OBJETIVOS | 5 |
| CAPITULO III. REVISION DE LITERATURA | 6 |
| 3.1. Germoplasma | 6 |
| 3.1.1. Principales actividades de los bancos de germoplasma | 7 |
| 3.1.2. Clasificación y funciones | 7 |
| 3.1.3. Definición de colección | 8 |
| 3.1.4. Conservación <i>In situ</i> | 9 |
| 3.1.5. Conservación <i>Ex situ</i> | 9 |
| 3.2. Diversidad de la especie y variabilidad | 10 |
| 3.3. Morfología del cultivo de haba | 11 |
| 3.3.1. Raíz | 11 |
| 3.3.2. Tallo | 11 |
| 3.3.3. Ramas y complejos axilares | 11 |
| 3.3.4. Hojas | 12 |
| 3.3.5. Flor | 12 |
| 3.3.6. Fruto | 12 |
| 3.3.7. Semilla | 12 |
| 3.4. Reproducción del haba | 12 |
| 3.5. Nombres comunes | 13 |
| 3.5.1. Las habas: origen y características | 13 |
| 3.5.2. Producción y rendimiento de haba en México | 14 |
| 3.5.3. Usos | 16 |
| 3.5.4. Limitaciones del cultivo | 17 |
| 3.5.5. Condiciones requeridas para el cultivo | 17 |
| 3.6. Composición química | 19 |
| 3.6.1 Características de los taninos | 19 |
| 3.6.2. Propiedades de los taninos | 19 |

| | | |
|--|--|-----------|
| 3.6.3. | Toxicidad de los taninos | 20 |
| 3.7. | Marcadores moleculares | 20 |
| 3.7.1. | Fragmentos polimórficos de ADN Amplificados al Azar (RAPD) | 22 |
| 3.7.2. | Microsatélites | 23 |
| 3.7.3. | Longitud de Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados (AFLP) | 24 |
| 3.7.4. | Aplicaciones y usos comunes de los marcadores moleculares | 24 |
| 3.7.5. | Ventajas de los marcadores moleculares | 24 |
| 3.8. | Mapas genéticos | 25 |
| CAPITULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS | | 26 |
| 4.1. | Material vegetal | 26 |
| 4.1.1. | Siembra en invernadero | 27 |
| 4.2. | Análisis de taninos | 28 |
| 4.2.1. | Material Biológico | 28 |
| 4.2.2. | Reactivos | 28 |
| 4.2.2.1. | Agente cromogénico (AC) | 29 |
| 4.2.2.2. | Solución estándar (SE) | 29 |
| 4.2.2.3. | Curva estándar | 29 |
| 4.2.2.4. | Preparación de las muestras | 30 |
| 4.2.3. | Ecuaciones para la estimación de taninos | 30 |
| 4.3. | Análisis de marcadores moleculares | 31 |
| 4.3.1. | Extracción de ADN | 31 |
| 4.3.2. | Estimación de la calidad del ADN genómico | 32 |
| 4.3.3. | Determinación de la cantidad del ADN | 33 |
| 4.3.4. | Establecimiento de las técnicas RAPD e ISSR | 33 |
| 4.3.4.1. | Iniciadores RAPDs | 33 |
| 4.3.4.2. | Electroforesis | 34 |
| 4.3.4.3. | Microsatélites (SSR) | 34 |
| 4.3.4.4. | Análisis de datos | 36 |

| | | |
|--|-------|--------|
| CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | ----- | 37 |
| 5.1. Taninos | ----- | 37 |
| 5.1.1. Contenido de taninos en las variedades de haba | ----- | 37 |
| 5.1.2. Contenido de taninos en los distintos colores de testa | ----- | 38 |
| 5.1.3. Correlaciones entre contenido de taninos y caracteres agronómicos del haba | ----- | 40 |
| 5.2. Caracterización molecular | ----- | 41 |
| 5.2.1. Calidad del ADN | ----- | 41 |
| 5.2.2. Selección de iniciadores RAPDs e ISSR | ----- | 42 |
| 5.2.3. Diversidad de cultivares de haba | ----- | 43 |
| 5.3. Propuesta Estratégica | ----- | 46 |
| 5.3.1. Acciones estratégicas | ----- | 46 |
| 5.3.2. Investigación | ----- | 47 |
| 5.3.3. Instituciones de apoyo | ----- | 48 |
| 5.3.4. Las organizaciones de productores | ----- | 48 |
| 5.3.5. Conservación del germoplasma | ----- | 49 |
| 5.3.6 Evaluación permanente y retroalimentación | ----- | 49 |
| 5.3.7. Recursos humanos | ----- | 50 |
| 5.3.8. Recursos materiales | ----- | 51 |
| 5.3.9. Resultados a mediano plazo | ----- | 51 |
| 5.3.10. Resultados del estudio | ----- | 51 |
| 5.3.11. Impacto | ----- | 51 |
| CAPITULO VI. CONCLUSIONES | ----- | 53 |
| CAPITULO VII. LITERATURA CITADA | ----- | 54 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Esquema de las etapas de la PCR ocurridas en un ciclo de amplificación del ADN. ----- | 22 |
| Figura 2. Ubicación de los estados donde fueron colectadas las variedades de haba utilizadas en la investigación. ----- | 26 |
| Figura 3. (a, b y c) Peso de hojas de haba, Acomodo de las muestras y molido de las mismas. ----- | 31 |
| Figura 4. Muestras de ADN de las variedades de haba cargadas en un gel de agarosa. ----- | 35 |
| Figura 5. Diferencias en cuanto al contenido de taninos en relación al color de la testa de haba. ----- | 39 |
| Figura 6. Calidad del ADN obtenido de hojas tiernas de plántulas de los genotipos de <i>Vicia faba</i> L. bajo estudio. ----- | 41 |
| Figura 7. Fragmentos de ADN amplificados con los iniciadores RAPDs en dos muestras de haba para detectar polimorfismos. ----- | 42 |
| Figura 8. Fragmentos de ADN amplificados con los iniciadores microsatélites en muestras de haba para detectar polimorfismos. ----- | 43 |
| Figura 9. Análisis de agrupamiento con el algoritmo UPGMA de 60 genotipos de <i>Vicia Fava</i> L., basado en una matriz de similitud genética construida a partir del Coeficiente de Dice. ----- | 44 |
| Figura 10. Esquema de una cadena productiva. ----- | 47 |
| Figura 11. Propuesta de líneas estratégicas para el aprovechamiento de la tecnología generada sobre las diferentes variedades de haba por los productores. ----- | 50 |

INDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Principales países productores de haba. ----- | 14 |
| Cuadro 2. Principales estados de México productores de haba en grano. ----- | 15 |
| Cuadro 3. Principales estados de México productores de haba en ejote. ----- | 15 |
| Cuadro 4. Principales estados de Puebla productores de haba en grano. ----- | 16 |
| Cuadro 5. Principales estados de Puebla productores de haba en ejote. ----- | 17 |
| Cuadro 6. Diluciones para generar una curva estándar de catequina. ----- | 29 |
| Cuadro 7. Condiciones de amplificación para los marcadores RAPDs. ----- | 34 |
| Cuadro 8. Características de los microsatélites analizados en las 60 variedades de haba. ----- | 35 |
| Cuadro 9. Condiciones de amplificación para los microsatélites. ----- | 36 |
| Cuadro 10. Contenido de taninos en variedades de haba en las cuales, medias de variedades con la misma letra no son significativamente diferentes. ----- | 37 |
| Cuadro 11. Correlaciones entre el contenido de taninos y diferentes caracteres agronómicos. ----- | 40 |

INDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Contenido de taninos en 60 variedades de haba. ----- | 60 |
| Anexo 2. Marcadores RAPDs polimórficos utilizados en 60 variedades de haba. ----- | 61 |

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

Las diferentes especies de vegetales cultivadas en el mundo y en cualquier región presentan diferencias morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y genéticas las cuales forman parte de sus características específicas. La importancia de una especie para el ser humano radica en el uso que ha encontrado de ella y así la incluye entre los satisfactores básicos que utiliza. Los recursos genéticos son la base de la creación de nuevos cultivares y del desarrollo y la diversidad genética, permite la obtención de cultivares adaptados a nuevas áreas agrícolas, condiciones de cultivo o de mejor rendimiento y calidad nutritiva. La conservación y utilización de los recursos genéticos es de importancia estratégica para la seguridad alimentaria y representa un potencial económico para la humanidad.

Las regiones de Centroamérica y Sudamérica son consideradas como las de mayor diversidad biológica del mundo; de hecho varias especies de importancia agrícola, agroindustrial, medicinal y farmacológica se han originado en estas regiones (Becerra y Paredes, 2000).

Actualmente existe un gran número de colecciones de germoplasma con genotipos de un alto valor agronómico que podrían ser usados como progenitores en los programas de mejoramiento genético; sin embargo, en muchas ocasiones se desconoce su grado de diversidad y la relación existente entre materiales, lo que dificulta su utilización (Becerra y Paredes, 2000). La selección de progenitores y la caracterización de la variabilidad genética existente son decisivas en la eficiencia de los programas de mejoramiento genético (Barbosa y Bered, 1998).

Las habas forman parte de los cultivos importantes en México y son una alternativa en las regiones con problemas de heladas. Además, contribuyen en la fijación de nitrógeno al suelo. En México la especie es diversa, lo cual se refleja en la variabilidad del cultivo. Una de las formas de aprovechar y conservar la especie es conocerla por la expresión de sus diferentes caracteres que le dan las propiedades intrínsecas. La búsqueda de variedades con rendimiento de grano superior a la media nacional es importante. Sin embargo, el conocimiento de otros factores, como la calidad nutrimental del grano, complementan los trabajos de evaluación de variedades.

Es importante para la alimentación de los habitantes del medio rural y en las ciudades, por el alto contenido nutritivo, toda vez que se puede consumir en verde o en grano seco para poder ser transformado en galletas, harinas, alimento balanceado y otros. En la actualidad los productores demandan variedades con mayor calidad de semilla.

No obstante a su importancia, en los últimos años el cultivo de haba ha sufrido un descenso en superficie cultivada, debido fundamentalmente a la ausencia de variedades mejoradas adaptadas al medio natural y a los ataques de plagas y enfermedades.

De acuerdo con la FAO, las migraciones del medio rural a las ciudades, están propiciando entre otros fenómenos, la pérdida de conocimiento sobre la cultura agrícola de pueblos indígenas, lo cual afecta a cultivos tradicionales ya sean nativos o introducidos, como en este caso del haba, que por cientos e incluso miles de años han constituido la base de la alimentación de grupos socialmente vulnerables, afectando la soberanía alimentaria principalmente de países en vías de desarrollo.

Lo anterior nos plantea una interesante alternativa para la obtención de alimentos, para una población en constante crecimiento, que no será necesariamente a través de la introducción de nuevas tecnologías agrícolas, o en algunos casos será necesario, pero en otros, basta con preservar lo que ya se tiene. Aun cuando la producción de algunos cultivos, es básicamente para autoconsumo no se debe descuidar la importancia de hacerlos rentables.

A través de diversos programas en América Latina, la FAO busca la perpetuación y en algunos casos la recuperación de culturas agrícolas endógenas, que tomen en cuenta la conservación de suelos, el manejo de agua, la biodiversidad de cultivos y tecnologías de transformación.

En nuestro país, investigadores del Colegio de Postgraduados, Díaz-Ruiz y Morales-Jimenez (2010), realizaron una investigación sobre el conocimiento campesino en la selección de variedades de haba, donde destacan como caracteres importantes el rendimiento de grano, color amarillo de la semilla, sabor, precocidad y tolerancia a la sequía. El conocimiento adquirido se ha ido transmitiendo de generación en generación, enriqueciéndose con la experiencia personal y las demandas de cada época.

Ha sido a través de las prácticas realizadas por los campesinos que se ha preservado el material genético, lo que ha significado un valioso acervo de conocimiento sobre las características que resultan idóneas, al momento de seleccionar las semillas. Lo anterior concuerda con lo expresado por Toledo (1991), en lo referente a la memoria, como el recurso campesino más importante, que se expresa como una síntesis histórica de conocimiento local. Conocimiento, que por sí mismo tiene el potencial de convertirse en un recurso agrícola que permita un óptimo aprovechamiento de un cultivo bajo determinadas condiciones agroecológicas o simplemente para corresponder a la demanda de características fenotípicas por parte del consumidor.

El aprovechamiento que le dan los campesinos a este cultivo, hace de gran interés retomar los conocimientos que han adquirido al respecto. Además de ser usadas como alimento humano, forraje y abono verde; esta planta como todas las leguminosas, desempeña un papel importante en la fijación de nitrógeno. También se ha contribuido a la preservación de los agroecosistemas mediante el papel que juegan en la rotación de cultivos con maíz y frijol.

En el caso de las habas existe variabilidad entre las variedades cultivadas por los agricultores, la cual es detectada por la expresión de caracteres morfológicos, por lo que es factible identificar variedades o líneas con calidad nutricional mediante el bajo contenido de taninos. A los taninos se les considera sustancias anti nutritivas, en dosis elevadas los taninos limitan la absorción de algunos nutrientes como el hierro y las proteínas. Sin embargo, actualmente los taninos se consideran antioxidantes por su capacidad de eliminar los radicales libres, previniendo la aparición de numerosas enfermedades degenerativas, entre ellas el cáncer. Por ejemplo, el vino tinto es rico en taninos, y a estos compuestos se les atribuyen efectos benéficos para la salud. Consumir vino tinto de forma moderada (dos vasos pequeños al día) es positivo para el sistema cardiovascular.

El germoplasma de haba forma parte de los recursos genéticos existentes en las regiones productoras y debe ser estudiado para comparar el comportamiento de las poblaciones locales, mediante la aplicación de técnicas utilizadas en diferentes áreas del conocimiento. En relación a lo anterior, se reporta mayor cantidad de trabajos sobre la evaluación de variedades por rendimiento de grano y sus componentes para seleccionar variedades por rendimiento de grano, sin tomar en cuenta la calidad nutrimental. Sin embargo, la diversidad reportada en los caracteres

color y tamaño de la semilla (Díaz-Ruiz *et al.*, 2000) es un indicio de la existencia de variabilidad en otros caracteres poco estudiados como el contenido de taninos.

La determinación del contenido de taninos en las diferentes variedades de haba cultivadas en México permitirá conocer el rango existente de dichos compuestos, identificar materiales con mínima y máxima cantidad e indirectamente el nivel nutricional de los materiales. La identificación de variedades con baja y alta cantidad de tales compuestos serán considerados en programas de mejoramiento genético llevados a cabo mediante técnicas clásicas y moleculares.

De igual forma, la descripción de la variabilidad y caracterización de la especie permitirá conocer la organización y dimensión de la riqueza poco exploradas que serán estudiadas mediante marcadores moleculares. La aplicación de esta técnica ayudará en el agrupamiento de variedades semejantes de la especie a través de regiones específicas del genoma.

Con base a lo anterior y considerando los resultados en este estudio, se plantean algunas líneas estratégicas enfocadas en la preservación y producción de haba, a partir del conocimiento campesino y del conocimiento generado por las ciencias modernas.

CAPITULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivos

- I. Determinar el rango en contenido de taninos en las semillas de haba cultivadas por los agricultores.
- II. Conocer las relaciones genéticas entre las variedades de haba cultivadas por los agricultores mediante la utilización de marcadores moleculares tipo RAPD y microsatélites.
- III. Proponer una estrategia de aprovechamiento de las variedades por los productores de haba con base a los caracteres estudiados.

Hipótesis

- I. Existen diferencias en el contenido de taninos en las diferentes variedades de haba cultivadas por los agricultores.
- II. Existen diferencias en la cercanía genética entre las variedades de haba cultivadas por los productores.

CAPITULO III. REVISIÓN DE LITERATURA

En este capítulo se discuten los elementos teóricos y conceptuales aplicados en esta investigación. Por tratarse de un estudio enfocado a la identificación y conservación de germoplasma promisorio para la alimentación humana, se discutieron los conceptos de germoplasma y sus formas de preservación *in situ* y *ex situ*. También se analizó la importancia de la diversidad y variabilidad de la especie de haba. La descripción morfológica, los usos y los requerimientos son aspectos importantes que se revisaron. Fundamental fue la revisión de los conceptos taninos, marcadores moleculares y mapas genéticos.

3.1. Germoplasma

Los bancos de germoplasma poseen colecciones de material vegetal con el objeto de rejuvenecer y preservar sus características para el futuro beneficio de la humanidad y del ambiente. Los bancos de germoplasma son llamados también “Centros de recursos Genéticos”, pues se le da gran importancia al hecho de que las plantas son fuente de genes que regulan atributos de interés y por ello de biodiversidad. Las plantas conservadas incluyen cultivos alimenticios económicamente importantes, especies hortícolas, forrajeras, plantas medicinales y árboles.

Los recursos genéticos para la alimentación y la agricultura constituyen la base biológica de la seguridad alimentaria mundial y contribuyen al sustento de las personas de la tierra. Estos recursos son la materia prima más importante de los fitomejoradores y un aporte imprescindible para los agricultores; por consiguiente son fundamentales para una producción agrícola sostenible.

En 1983 la Conferencia de la FAO estableció la Comisión de Recursos Fitogenéticos (RF), actualmente Comisión sobre Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura (RFAA). Desde entonces ha desarrollado el Sistema Mundial para la Conservación y Utilización Sostenible de los RFAA, del cual, tanto el informe sobre el estado de los RF en el mundo como el Plan de Acción Mundial son elementos fundamentales (Puldón, 2006).

3.1.1. Principales actividades de los bancos de germoplasma

Para que el germoplasma pueda ser aprovechado los bancos de germoplasma deben realizar las siguientes actividades, de acuerdo con Puldón (2006):

- I. Adquisición de muestras de nuevo germoplasma.
- II. Multiplicación y regeneración.
- III. Caracterización y evaluación preliminar.
- IV. Documentación e intercambio de información.
- V. Conservación.
- VI. Suministro de germoplasma.
- VII. Colaboración con otros centros de RF.
- VIII. Organización de reuniones técnicas y talleres de capacitación.
- IX. Investigación (Ej. fisiología de las semillas).

3.1.2. Clasificación y funciones (Puldón, 2006)

Los bancos de germoplasma difieren uno de otros en sus actividades y en la manera en que éstas se organizan y se realizan. Se pueden identificar cuatro categorías principales en los Bancos de Germoplasma de acuerdo a sus principales propósitos:

1. Banco de Germoplasma Institucional: Se establece con el objetivo de conservar únicamente el germoplasma que se utiliza en los programas de investigación del instituto o centro de investigación agrícola asociado.
2. Banco de Germoplasma Nacional: Se establecen como Centro de Recursos Fitogenéticos Nacionales que conserva gran cantidad de muestras distintas de germoplasma de interés actual o potencial. Contiene germoplasma que ha sido recolectado a nivel nacional, puede estar asociado a un programa de investigación o a la realización de la suya propia. Un Banco de Germoplasma Nacional puede ser una empresa de colaboración entre Institutos Nacionales o bajo la responsabilidad de un Instituto que colabora con otros Institutos Nacionales.

3. Banco de Germoplasma Regional: Se concibe como una empresa colaboradora entre varios países que pertenecen a la misma región geográfica, con el fin de conservar germoplasma de la región y apoyar la investigación, por ejemplo el Banco de Germoplasma Regional en el Sur de África (SADC), Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).

4. Centro Internacional: La mayoría de estos centros de investigación agrícola internacional (CIAI) poseen colecciones sustanciosas de germoplasma, centradas en cuestiones específicas, llamadas de mandato y también otros cultivos. Gran parte del germoplasma que se colecta a nivel mundial se conserva para beneficio de las actividades de los recursos fitogenéticos en todo el mundo. Un ejemplo es el IRRI (*O. sativa*, *O. glaberrima*, especies híbridas y silvestres) WARDA en Costa de Marfil.

Es poco frecuente que los Bancos de Germoplasma trabajen aislados de otros bancos o programas de recursos genéticos. Existe cooperación entre bancos institucionales y nacionales, así como de estos con los centros internacionales. Este tipo de colaboración estimula el desarrollo mutuo y un funcionamiento efectivo para la conservación de los Recursos Fitogenéticos.

3.1.3. Definición de colección (Puldón, 2006)

- I. Grupo de germoplasma, de accesiones que se conservan con un objetivo específico y en determinadas condiciones.
- II. Accesoión: Muestra distinta de germoplasma que se mantiene en un banco de germoplasma para su conservación y uso.

El germoplasma se conserva en diferentes colecciones, éstas son utilizadas por el banco de germoplasma de diferentes maneras. Existen tres tipos de colecciones fundamentales: base, activa y de trabajo.

- I. Colección Base: Es una colección de germoplasma que se conserva a largo plazo y no es usada como fuente de distribución rutinaria. Es una representación de toda la variabilidad genética existente. Generalmente se almacena a temperatura bajo cero, con un bajo contenido de humedad.

- II. Colección Activa: Es la que se utiliza para regeneración, multiplicación, distribución, caracterización y evaluación. Debe mantenerse en cantidad suficiente con el fin de estar disponible cada vez que sea necesario. Generalmente se duplica en una colección base y se almacena a mediano o largo plazo.
- III. Colección de Trabajo: Es una colección que utilizan los fitomejoradores o investigadores en su trabajo. La conservación no constituye una prioridad. Ej: un grupo de accesiones derivadas de una colección activa.

También podemos encontrar los términos de “colección de campo” y “colección *in vitro*”.

- I. Colección de campo: Es una colección de plantas. Ej.: frutales, cultivos de invernadero, que se mantiene en el campo. Esto se hace con aquel germoplasma que de otro modo hubiera sido difícil mantener en forma de semilla.
- II. Colección *in vitro*: Es aquella que guarda el material genético en forma de tejidos de plantas que crecen en un cultivo activo en un medio sólido o líquido. Se almacena a temperaturas muy bajas. Ej: en nitrógeno líquido a -196° (crioconservación).

3.1.4. Conservación *in situ*

Significa conservar en el lugar. Tradicionalmente los programas de conservación *in situ* han sido importantes sobre todo para la conservación de los bosques y los lugares valiosos por su flora silvestre y fauna o su interés ecológico. Mientras que la conservación *in situ* es habitual para los recursos forestales, su uso ofrece posibilidades para la conservación de otros RFAA.

La conservación *in situ* está generalmente relacionada con el establecimiento de zonas protegidas. Muchas de ellas contienen RFAA, pero la conservación de estos recursos es a menudo deficiente y en ocasiones se ha puesto en duda su efectividad para la conservación de la diversidad genética debido a que los inventarios son mínimos y a la falta de atención hacia la diversidad interespecífica e intraespecífica (Di Castri y Younes, 1990).

3.1.5. Conservación *ex situ*

Significa conservar fuera del lugar de colecta.

El principal método de conservación de los recursos fitogenéticos ha sido el uso de los Bancos de Germoplasma *ex situ* (almacenamiento de semillas a bajas temperaturas y humedad). Se han establecido metodologías y directrices para la recolección de muestras representativas de diversidad genética de numerosos cultivos, y cada vez se aplican más en las misiones de recolección (Sinha, 1981).

Hay varios métodos de almacenamiento del germoplasma que difieren en función de la finalidad de la conservación, comportamiento de las especies mediante este y los recursos disponibles.

El método de conservación a emplear depende fundamentalmente del tipo de semilla, la cual puede ser de dos tipos:

1. Ortodoxa: Son aquellas semillas que se pueden secar (Delouche, 1980) y mantener en condiciones viables a temperaturas bajo cero y con escasa humedad durante años (Ellis *et al.*, 1985), ejemplo arroz, maíz, trigo, cebolla, zanahoria, remolacha, calabaza, berenjena, etc.
2. Recalcitrantes: Son aquellas que no se pueden secar, ni conservar durante períodos largos con una temperatura y humedad bajas, ejemplo mango, aguacate, zapote, caoba, cacao, coco, canela, té, etc.

3.2. Diversidad de la especie y variabilidad

Los numerosos tipos de haba cultivados, hacen que la sistemática de la especie sea muy confusa; en general se reconoce válida la subdivisión de haba en tres grupos botánicos, en atención al tamaño de la semilla y las vainas de acuerdo con Hebblethwaite (1983):

- I. *Vicia faba* variedad minor (Harz) Beck: esta variedad botánica se caracteriza por presentar semillas pequeñas, de 1 a 1.2 cm de longitud. Este tipo predomina como cultivo en el norte de Europa, especialmente en Gran Bretaña, en el Valle del Nilo, India y Norteamérica, pero su utilización principal es forrajera o como abono verde.
- II. *Vicia faba* variedad equina Pers.: las semillas de este grupo son de tamaño intermedio, de 1.2 a 1.4 cm de longitud. Este tipo, como sus nombres latino e inglés ("horse bean") lo

indican, se utiliza preferentemente en la alimentación de ganado y no se recomienda para consumo humano.

- III. *Vicia faba* variedad mayor (Harz) Beck: este grupo presenta los granos más grandes de la especie (1.5 a 3.0 cm de largo). Esta variedad botánica es la más usada como haba verde en el mundo, especialmente en Asia, América Latina y Europa. En esta variedad se distinguen los cultivares "asiáticos" de vaina corta, gruesa y con pocos granos muy grandes como Jumbo y Nintoku Giant, los cultivares "europeos" de vaina larga, gruesa, de varios granos como los españoles Aguadulce y Muchamiel, y de otros países como Portuguesa (Portugal), D'Aquitaine (Francia), Windsor (Inglaterra) y Witkiem (Holanda).

3.3. Morfología del haba

3.3.1. Raíz

La radícula es la parte del embrión de las plantas que da lugar a la raíz. Ésta se convertirá en raíz principal del haba, de la que crecerán otras secundarias, terciarias y cuaternarias. En una última división nacen los pelos absorbentes, que asimilan el agua y nutrientes de los que se alimenta la planta.

3.3.2. Tallo

Es el eje central de la planta y está formado por una sucesión de nudos -los puntos de los que crecen las hojas- y entrenudos -la distancia que existe entre los nudos-. El tallo es herbáceo y tiene una sección cilíndrica. Normalmente es vertical y puede crecer erecto, semipostrado o postrado según el hábito de crecimiento de cada variedad.

3.3.3. Ramas y complejos axilares

Las ramas del haba crecen a partir de los complejos axilares, formados por tres yemas visibles desde el principio de su desarrollo. Las yemas pueden tener un crecimiento de tres tipos: completamente vegetativo, de la que sólo saldrían ramas, floral y vegetativo, que origina flores y ramas, o completamente floral, de la que únicamente crecerán flores.

3.3.4. Hojas

Las habas tienen dos tipos de hojas diferentes. Las primeras en salir son las simples, que caen antes de que la planta esté completamente desarrollada. Posteriormente aparecen las hojas compuestas, conformadas por tres folíolos enteros de forma oval o triangular. El color y pilosidad de las hojas depende de la variedad y edad de la planta.

3.3.5. Flor

En el momento de su nacimiento, presentan forma de botón. Una vez abiertas, las flores del haba alcanzan un aspecto semejante al de las mariposas. Son axilares, agrupadas en racimos cortos de dos a ocho flores, poseyendo una mancha grande de color negro o violeta en las alas, que raras veces van desprovistas de mancha. Sus pétalos pueden ser de color verde, blanco, rosado o púrpura.

3.3.6. Fruto

Los frutos del haba son las vainas, que constan de dos valvas. Normalmente su parte exterior es lisa y cerosa, aunque puede presentar pubescencia. El color de las legumbres depende de la variedad y de la edad del haba, pudiendo existir vainas uniformes o con rayas. La vaina, de forma oval, contiene en su interior entre cuatro y diez semillas.

3.3.7. Semilla

Las semillas del haba constituyen su parte comestible. Éstas pueden presentar diversos colores y formas, dependiendo de la variedad de la planta. Dentro de las semillas, en los cotiledones, se encuentran las reservas nutritivas necesarias para el desarrollo de nuevas habas.

3.4. Reproducción del haba

Se emplea la misma semilla para su reproducción. Entre los meses de noviembre a febrero, dependiendo de la zona climática, se pueden plantar. Para que la germinación tenga más posibilidades de éxito se las debe dejar unas horas en remojo con agua y tras eso ser plantadas y acto seguido regar la tierra. Se suelen plantar entre 10 y 14cm de distancia entre semillas. Es

muy conveniente que el cultivo este protegido del viento. Se puede hacer dos siembras de esta planta para recolectar en diferentes épocas del año, finales de noviembre y enero. Las cosechas suelen ser de cuatro o cinco meses entre la siembra y la recolecta. Se las puede recolectar, antes de su maduración completa y en ese caso se cocinan junto con la vaina (Wright, 1979).

3.5. Nombres comunes

El haba es conocida por diferentes nombres que cambian según la región y el país. Algunos de estos nombres son los siguientes: Haba, frijol haba, Horsebean, Windsorbean, Tickbeans (tipos pequeños), Bakela (Etiopía), Boby kurmovje (antigua URSS), Faveira (Portugal) Ful masri (Sudán) Feve (francés) y Yeshil Bakla (Turquía).

I Nombre científico: *Vicia faba* L.

II Familia: *Favaceas*

III Género: *Vicia*

III Especie: *faba*

3.5.1. Las habas: origen y características

Las habas, fueron unas de las primeras leguminosas domesticadas por el hombre desde que se inició el nuevo régimen de vida que hoy conocemos como agricultura. El cultivo tuvo su centro de origen en el Próximo Oriente desde donde se extendió al Mediterráneo y posteriormente al resto del mundo. *Vicia faba* es una excepción entre las leguminosas de grano ya que no se ha identificado su progenitor silvestre. No obstante, el grupo paucijuga (Cubero, 1974), actualmente presente desde Afganistán a la India, (Zohary y Hopf, 1973; Duc, 1997) es la forma primitiva considerada como más cercana al extinguido progenitor silvestre. La distribución del cultivo por el mundo condujo a la selección para distintos factores adaptativos, distintos caracteres agronómicos relacionados con la arquitectura de la planta así como al tamaño, peso y forma de sus semillas. Considerando los caracteres de las semillas se pueden diferenciar cuatro grupos: paucijuga, minor, equina y mayor (Cubero, 1974). *Paucijuga* pesa entre 0.31-0.40 g semilla⁻¹, *minor* 0.41-0.60, *equina* 0.61-1.10 y *mayor* 1.11-1.70 g.

Sin embargo, de acuerdo a la clasificación realizada por Cubero (1974), en México, solo se tienen identificados hasta el momento dos grupos botánicos de haba denominados *mayor* y *equina*. Estos dos tipos están integrados por los diferentes colores existentes en México, los cuales son amarillo, beige o blanca, roja o morada y moteada o parraleña (Díaz-Ruiz *et al.*, 2006).

El haba es el segundo cultivo más extendido en la Unión Europea dentro de las legumbres en grano seco, sin embargo la UE es el cuarto productor mundial (FAO, 2003).

México con una producción de 53 mil toneladas, se encuentra entre los 9 principales países productores a nivel mundial, lista encabezada por Argelia, China, Chipre y Marruecos con una producción superior a las 100 mil toneladas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Principales países productores de haba.

| Países | Producción habas verdes año 2002 (toneladas) |
|------------------------|--|
| Argelia | 125.000 |
| China | 115.991 |
| Chipre | 110.000 |
| Marruecos | 103.820 |
| España | 73.100 |
| Italia | 66.764 |
| Perú | 66.085 |
| Iraq | 60.000 |
| México | 53.000 |
| Siria, República Árabe | 51.290 |

3.5.2. Producción y rendimiento de haba en México

En nuestro país el principal estado productor de haba para grano es Puebla, por lo que es en este estado donde se centran las principales investigaciones sobre variedades existentes. El segundo lugar en cuanto a superficie cultivada es Veracruz seguido por Tlaxcala. Los rendimientos más altos corresponden a Sonora con una producción de 2.500 ton ha⁻¹ de riego, los más bajos se dan en Zacatecas con 0.69 ton ha⁻¹ de temporal (Cuadro 2).

Cuadro 2. Principales estados de México productores de haba en grano.

| Ubicación | Sup. Sembrada (Ha) | Sup. Cosechada (Ha) | Producción (Ton) | Rendimiento (Ton/Ha) | PMR (\$/Ton) | Valor Producción (Miles de Pesos) |
|---------------|--------------------|---------------------|------------------|----------------------|-----------------|-----------------------------------|
| PUEBLA | 14,392.12 | 13,937.12 | 19,140.32 | 1.37 | 7,722.9 | 147,819.9 |
| VERACRUZ | 2,655.00 | 2,655.00 | 3,725.00 | 1.40 | 8,448.5 | 31,470.8 |
| TLAXCALA | 2,743.00 | 2,743.00 | 2,652.33 | 0.97 | 6,218.4 | 16,493.4 |
| MEXICO | 295.00 | 295.00 | 654.27 | 2.22 | 7,837.9 | 5,128.1 |
| HIDALGO | 886.00 | 885.00 | 847.00 | 0.96 | 5,325.7 | 4,510.9 |
| MICHOACAN | 174.00 | 174.00 | 150.10 | 0.86 | 6,453.0 | 968.6 |
| MORELOS | 20.00 | 20.00 | 80.00 | 4.00 | 9,820.0 | 785.6 |
| OAXACA | 63.00 | 63.00 | 59.72 | 0.95 | 4,509.6 | 269.3 |
| SONORA | 9.00 | 9.00 | 22.50 | 2.50 | 4,000.0 | 90.0 |
| ZACATECAS | 18.00 | 18.00 | 12.50 | 0.69 | 5,656.0 | 70.7 |
| GUERRERO | 3.00 | 3.00 | 6.00 | 2.00 | 10,000.0 | 60.0 |
| GUANAJUATO | 16.00 | 16.00 | 12.80 | 0.80 | 1,300.0 | 16.6 |
| | 21,274.12 | 20,818.12 | 27,362.54 | 1.31 | 7,590.09 | 207,684.1 |

SAGARPA, 2008.

El Estado de México destaca en la producción de haba verde, seguido por Puebla y Tlaxcala. El rendimiento más alto se da en Baja California con 11.33 ton ha⁻¹ y el más bajo en Veracruz con 1.10 ton ha⁻¹ (Cuadro 3).

Cuadro 3. Principales estados de México productores de haba en ejote.

| Ubicación | Sup. Sembrada (Ha) | Sup. Cosechada (Ha) | Producción (Ton) | Rendimiento (Ton/Ha) | PMR (\$/Ton) | Valor Producción (Miles de Pesos) |
|------------------------|--------------------|---------------------|------------------|----------------------|-----------------|-----------------------------------|
| MEXICO | 5,461.00 | 5,461.00 | 36,302.42 | 6.65 | 4,498.13 | 163,292.95 |
| PUEBLA | 1,073.00 | 1,066.00 | 4,734.40 | 4.44 | 4,913.16 | 23,260.87 |
| TLAXCALA | 1,441.00 | 1,441.00 | 5,751.60 | 3.99 | 3,736.27 | 21,489.52 |
| MICHOACAN | 809.50 | 809.50 | 4,253.00 | 5.25 | 3,295.09 | 14,014.00 |
| BAJA CALIFORNIA | 81.50 | 81.00 | 917.91 | 11.33 | 7,665.01 | 7,035.78 |
| HIDALGO | 212.00 | 212.00 | 1,511.00 | 7.13 | 2,597.35 | 3,924.60 |
| DISTRITO FEDERAL | 286.80 | 286.80 | 736.27 | 2.57 | 4,551.63 | 3,351.23 |
| MORELOS | 103.00 | 103.00 | 713.00 | 6.92 | 4,520.90 | 3,223.40 |
| VERACRUZ | 180.00 | 180.00 | 198.00 | 1.10 | 3,000.00 | 594.00 |
| DURANGO | 4.00 | 4.00 | 32.30 | 8.08 | 6,142.41 | 198.40 |
| JALISCO | 4.00 | 4.00 | 24.80 | 6.20 | 6,500.00 | 161.20 |
| | 9,655.80 | 9,648.30 | 55,174.70 | 5.72 | 4,359.71 | 240,545.96 |

SAGARPA, 2008 Haba verde.

En el Estado de Puebla en cuanto a la producción de haba en grano el rendimiento más alto corresponden al Distrito de Desarrollo Rural (DDR) de Libres con una producción de 1.54 ton ha⁻¹, y el más bajo se da en el DDR de Tehuacán con 0.26 ton ha⁻¹ (Cuadro 4).

Cuadro 4. Principales estados de Puebla productores de haba en grano.

| Distrito | Sup. Sembrada (Ha) | Sup. Cosechada (Ha) | Producción (Ton) | Rendimiento (Ton/Ha) | PMR (\$/Ton) | Valor Producción (Miles de Pesos) |
|---------------------|--------------------|---------------------|------------------|----------------------|-----------------|-----------------------------------|
| LIBRES | 11,054.1 | 10,824.12 | 16,626.80 | 1.54 | 8,005.85 | 133,111.7 |
| TEZIUTLÁN | 1,600.0 | 1,600.00 | 1,280.00 | 0.80 | 4,200.00 | 5,376.0 |
| TECAMACHALCO | 676.0 | 582.00 | 422.00 | 0.72 | 7,059.96 | 2,979.3 |
| ZACATLÁN | 630.0 | 521.00 | 481.90 | 0.92 | 7,636.50 | 3,680.0 |
| CHOLULA | 357.0 | 357.00 | 315.92 | 0.88 | 8,113.95 | 2,563.3 |
| TEHUACÁN | 75.0 | 53.00 | 13.70 | 0.26 | 8,000.00 | 109.6 |
| | 14,392.12 | 13,937.12 | 19,140.32 | 1.37 | 7,722.96 | 147,819.9 |

Año Agrícola 2008 Modalidad: Riego + Temporal haba grano, SAGARPA, 2008

El DDR de Libres destaca en la producción de haba verde, seguido por el DDR de Cholula y Tecamachalco. El rendimiento más alto se da en Cholula con 9.78 ton ha⁻¹ y el más bajo en Tecamachalco con 3.6 ton ha⁻¹ (Cuadro 5).

Cuadro 5. Principales estados de Puebla productores de haba en ejote.

| Distrito | Sup. Sembrada (Ha) | Sup. Cosechada (Ha) | Producción (Ton) | Rendimiento (Ton/Ha) | PMR (\$/Ton) | Valor Producción (Miles de Pesos) |
|---------------------|--------------------|---------------------|------------------|----------------------|-----------------|-----------------------------------|
| CHOLULA | 104.00 | 104.00 | 1,017.00 | 9.78 | 7,627.07 | 7,756.73 |
| LIBRES | 670.00 | 670.00 | 2,825.00 | 4.22 | 4,552.21 | 12,860.00 |
| TECAMACHALCO | 299.00 | 292.00 | 892.40 | 3.06 | 2,962.95 | 2,644.14 |
| | 1,073.00 | 1,066.00 | 4,734.40 | 4.44 | 4,913.16 | 23,260.87 |

Año Agrícola 2008 Modalidad: Riego + Temporal haba verde, SAGARPA, 2008

3.5.3. Usos

El haba se utiliza como alimento humano en los países en desarrollo y también es destinada al consumo animal, principalmente a los cerdos, caballos, aves de corral y palomas en los países industrializados (Bond *et al.*, 1985). Es factible consumirla como verdura en vainas verdes y en grano seco, fresco o enlatado, es un desayuno común en el Oriente Medio, la región

mediterránea, China y Etiopía (Bond *et al.*, 1985). La paja también puede utilizarse para la fabricación de ladrillos y como combustible en algunas partes de Sudán y Etiopía (Duke, 1981).

3.5.4. Limitaciones del cultivo

Entre las principales enfermedades causadas por hongos, las cuales varían en incidencia y severidad de una región a otra son las siguientes: Ascoquita (*Ascochyta fabae* Speg.) causa daños en hojas, tallos y vainas, en las hojas las lesiones son circulares o elípticas hundidas y de color marrón oscuro, al crecer las lesiones, el centro se observa de color gris y se desarrollan los cuerpos fructíferos denominados picnidios, las lesiones en tallos son similares pero más alargadas. Roya (*Uromyces viciae-fabae* (Pers.) Shört) produce lesiones locales en hojas y tallos, la epidermis es destruida permitiendo la aparición de masas pulverulentas de esporas (Rubiales, 1996). Mancha de chocolate (*Botrytis fabae* Sardiña) daña principalmente las hojas aunque también puede presentarse en tallos y flores, en las hojas aparecen puntos pequeños color marrón-rojizo o pueden ser manchas circulares con el margen del color mencionado y el centro color café claro (Bernier *et al.*, 1984). Mildiu (*Peronospora viciae* Berk. Caspary) forma manchas marginales en las hojas provocando su desecación (Maroto, 1989).

3.5.5. Condiciones requeridas para el cultivo

Las habas se consideran plantas anuales, que responden a fotoperiodos largos (Duc, 1997). El hábito de crecimiento puede ser indeterminado ó determinado, siendo el primero el más común. Las semillas del grupo *minor* y *paucijuga* pueden presentar dormancia, la cual se inhibe exponiéndolas a 10 °C durante tres días (Ramsay, 1997). La germinación de las habas se ve favorecida con temperaturas nocturnas entre 5-20 °C y temperatura diurna de 20 °C. Sin embargo las semillas no germinan a temperaturas por encima de 20 °C (Nadal *et al.*, 2004). El aborto de flores y vainas inmaduras se presenta con temperaturas superiores a 30 °C. Los mejores suelos para su siembra son los arcilloso-limosos y calizos con pH neutro, aunque se adapta a un rango de pH entre 6 y 9 (Maroto, 1989). El inicio de floración puede activarse exponiendo las plantas a temperaturas de aproximadamente 10 °C. Al mismo tiempo, estas temperaturas ayudan a romper una reacción inhibitoria al inicio de floración, la cual se expresa principalmente cuando la planta se expone a temperaturas superiores a 14 °C (Guerrero, 1983).

La polinización es un fenómeno importante para la fertilización y producción del cultivo. La polinización cruzada es variable entre localidades y años, la cual depende de la población de insectos polinizadores. Los principales polinizadores son los insectos del género *Bombus* y las abejas del género *Apis*. Estos insectos pueden realizar la polinización cruzada mediante el transporte de polen de unas plantas a otras y la autopolinización de las plantas al penetrar en la flor transportando el polen de las anteras de la misma flor o poniendo en contacto directo las anteras con los estigmas (Guerrero, 1983).

3.6. Composición química

Se ha reportado amplia variación del contenido de proteínas (20-41%) (Chavan *et al.*, 1989). La concentración de proteínas está influenciada por los factores genéticos y ambientales y se ha reportado que la herencia de este rasgo es aditivo con algún dominio parcial (Bond *et al.*, 1985).

La digestibilidad de las proteínas y valor biológico, varían de 15.5% a 82% respectivamente (Hulse, 1994). El haba contiene pequeñas cantidades de posibles factores antinutricionales; sin embargo, sus efectos son menos agudos, y los inhibidores de la proteasa son considerados menores (2%), en comparación con las concentraciones en soya (Lawes, 1980; Bond *et al.*, 1985).

La inhalación de polen o la ingestión de las semillas pueden incitar a la condición conocida como favismo, una severa anemia hemolítica, quizás hasta causar colapso (Smart, 1990). Se trata de una deficiencia enzimática heredada ocasionalmente entre los pueblos del Mediterráneo (Grecia e Italia). El trastorno genético ocurre en cerca del 1% de personas blancas y 15% de personas negras (Duke, 1981). El contenido de aminoácidos con excepción de la metionina está razonablemente bien equilibrado (Bond *et al.*, 1985; Hussein y Saleh, 1995; Smart, 1990).

3.6.1. Características de los taninos

Los taninos son compuestos polifenólicos muy astringentes y de gusto amargo. Se dividen en hidrolizables y condensados. Industrialmente se han utilizado sus propiedades para curtir pieles, al eliminar el agua de las fibras musculares. Los egipcios ya utilizaban los frutos de la acacia

para esta finalidad. Es bien conocido el castaño (*Castanea sativa*) por producir un tanino hidrolizable que se utiliza en la industria de la piel.

La importancia de los taninos en el mundo vegetal es su capacidad para proteger las plantas contra las heridas que sufren y el hecho de que les protegen de los ataques exteriores, bien porque resultan tóxicos para los microorganismos o bien porque no son digeribles por estos últimos (Angulo y Quiroz, 1999).

Son astringentes, produciendo sequedad en las mucosas de la boca al comerlos.

3.6.2. Propiedades de los taninos

Curación de heridas y cuidado de la piel: Los taninos cumplen una función cicatrizante al acelerar la curación de las heridas y hemostática, al detener el sangrado (Valdizan y Maldonado, 1922). La cicatrización se produce por la formación de las costras al unirse las proteínas con los taninos y crear un medio "seco" que impide el desarrollo de las bacterias. Al constreñir los vasos sanguíneos ayudan a la coagulación de la sangre y por lo tanto, contribuyen a la curación de las heridas. *Achillea millefolium* L. o el *Plantago major* L., por ejemplo, son dos plantas que se utilizan con esta finalidad. Entre las aplicaciones podríamos mencionar:

- I. El tratamiento de las hemorroides (una decocción de la corteza de roble podría utilizarse con esta finalidad).
- II. La curación de las úlceras de la boca (Las infusiones de hojas secas de fresa son muy astringentes y pueden ser útiles).
- III. Tratamientos para la garganta irritada (El *Aloe vera* contiene muchos taninos y su jugo diluido en agua resulta adecuado para realizar gargarismos).
- IV. Además de éstos, hay mas usos en fitoterapia y aplicación en la cosmética y resultan útiles para el cuidado externo de la piel, ayudando a la curación de granos, espinillas o a la eliminación de la grasa en las pieles, entre otros (Feo, 1991). Una de las plantas con gran proporción de taninos utilizada para esta finalidad es la salvia o *la hamamelis* (Feo, 1991).

3.6.3. Toxicidad de los taninos

Las plantas medicinales que contienen taninos, utilizadas medicinalmente en las dosis adecuadas, proporcionan remedios adecuados para el tratamiento de muchas enfermedades. Sin embargo, un uso inadecuado de plantas que contienen proporciones altas de estos componentes resulta tóxica (Valdizan y Maldonado, 1922).

3.7. Marcadores moleculares

Existen diferentes técnicas de marcadores moleculares para detectar polimorfismos en el ADN. Para definir la técnica a utilizar se debe tomar en cuenta la finalidad, la resolución genética deseada, así como los costos (Müller y Wolfenbarger, 1999).

El polimorfismo basado en proteínas ha sido de gran utilidad en las investigaciones realizadas en plantas, pero con el desarrollo de las tecnologías basadas en ADN, la investigación en esta área se ha visto favorecida con la disponibilidad de una mayor cantidad de marcadores, aquellos basados en Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP) y en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Ambos métodos han derivado en múltiples técnicas como son la Amplificación de ADN al Azar (RAPD), Longitud de Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados (AFLP) y microsatélites (SSR), los cuales son los más utilizados en estudios de caracterización vegetal.

De acuerdo con Xu (2003), los marcadores de ADN pueden clasificarse en cuatro tipos según el método utilizado para detectar el polimorfismo:

- I. Hibridación ADN-ADN como los RFLPs,
- II. Marcadores basados en la PCR (Polymerase Chain Reaction) entre los que se encuentran los RAPD, SSR, STS, SCAR, EST, etc.
- III. Combinación entre la técnica de PCR y enzimas de restricción como los AFLP,
- IV. Los SNPs que revelan diferencias a nivel de un solo nucleótido.

Entre los marcadores basados en PCR, se encuentran los que contienen secuencias arbitrarias como los RAPDs y los de secuencias conocidas, en este grupo podemos citar los SSR, STS,

SCARs, ESTs, CAPs, SNPs, etc. La PCR es un método enzimático capaz de producir entre 10⁸ y 10⁹ ó más copias de ADN proveniente de células, bacterias, virus ó plantas en un tiempo de dos horas aproximadamente. En síntesis, la PCR requiere ADN como molde, uno ó dos iniciadores o “primers” y una polimerasa termoestable. Estos componentes son sometidos a repetidos ciclos a distintas temperaturas para que ocurran las fases de desnaturalización (Figura 1) que implica la separación de las cadenas de ADN, la hibridación (Figura 1) donde los iniciadores se unen a las cadenas simples complementarias, la extensión (Figura 1), que implica la síntesis en las regiones delimitadas por los iniciadores mediante la acción de la Taq polimerasa que replica el molde utilizando el iniciador como secuencia de inicio y, la extensión final (Figura 1) donde el producto sintetizado pasa a ser el molde del siguiente ciclo (White *et al.*, 1989; Heidelberg, 1994). Este proceso se repite al menos 30 veces, según las condiciones de amplificación específicas para cada marcador. La amplificación del fragmento es exponencial, pero después de 20 ciclos el número de productos moleculares excede al número de moléculas enzimáticas y la amplificación tiende a disminuir (Heidelberg, 1994).

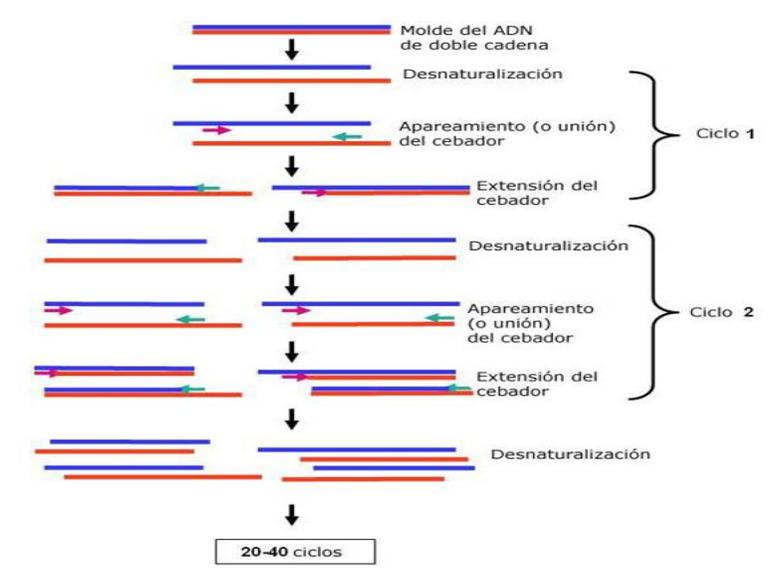


Figura 1. Esquema de las etapas de la PCR ocurridas en un ciclo de amplificación del ADN.

3.7.1. Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados al Azar (RAPD)

Recientemente, se ha desarrollado una serie de técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (White *et al.*, 1989). El principio de esta técnica se basa en la amplificación al azar de fragmentos de ADN usando un iniciador, ADN genómico molde, nucleótidos, cloruro de magnesio y Taq ADN polimerasa. Esta reacción es sometida a diferentes condiciones cíclicas de temperatura, lo que permite la amplificación *in vitro* de múltiples fragmentos de ADN a partir de una cadena molde.

A partir de la PCR se han generado una serie de técnicas, tales como la de Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificado al Azar (RAPD). Esta técnica usa iniciadores aleatorios de 10 pares de bases (pb) (Williams *et al.*, 1990) para amplificar el ADN. Los productos de la amplificación son separados mediante electroforesis y las bandas visualizadas de diferente peso molecular representan diferentes *loci*. En algunas especies, la técnica da la opción de usar dos o más iniciadores dentro de la misma reacción para aumentar el número de bandas, logrando una mayor cantidad de información por reacción (Williams *et al.*, 1990).

3.7.2. Microsatélites

Las secuencias de ADN de microsatélites (SSR) son dos categorías de secuencias repetidas que se presentan en eucariontes. Ellas se encuentran repetidas en tandem y dispersas a través del genoma representando muchos *loci*. Cada *locus* tiene distinto número de repeticiones variable, asociándose de esta manera a alelos específicos de alta variabilidad. A través del uso de estos marcadores se han obtenido patrones complejos de ADN en animales, plantas, y microorganismos (Condit y Hubbell, 1991).

Los microsatélites representan secuencias de 1 a 5 nucleótidos repetidas en tandem y existen en forma abundante en plantas (Condit y Hubbell, 1991). Mediante estos marcadores se puede medir la diversidad entre genotipos amplificando mediante PCR la región del ADN genómico que contiene estas secuencias. El uso de microsatélites ha ido aumentando mediante la producción de bibliotecas de iniciadores y la secuenciación automática fluorescente que permiten el diseño de los iniciadores que rodean los microsatélites (Brondani *et al.*, 1998). Los fragmentos generados son separados en geles de agarosa o de poliacrilamida y son visualizados radioactivamente o por tinción (Brondani *et al.*, 1998).

Los microsatélites son muy atractivos para los genetistas pues combinan varias ventajas como son su codominancia, multialelismo y su alta heterocigosidad (Brondani *et al.*, 1998). El alto nivel de polimorfismo que detecta permite una discriminación precisa entre individuos altamente emparentados. Además de ser altamente polimórficos, los microsatélites usan cantidades mínimas de ADN, equivalentes a las que se usan en RAPD. Las condiciones de amplificación y de reacción son especie-específicas y la variación en el largo de los productos amplificados mediante PCR es función del número de unidades repetidas.

En general, la amplificación de microsatélites ha demostrado que éstos son más variables que las isoenzimas, RFLP, AFLP y RAPD. Por ejemplo, en *Cucumis 29* las isoenzimas no mostraron polimorfismo entre dos genotipos comerciales (Perl-Treves *et al.*, 1985). Dentro del mismo género, los RAPDs detectaron un 38% de polimorfismo, mientras que con los microsatélites se obtuvo el 71%, e incluso detectaron diferencias genéticas entre cultivares altamente emparentados que mediante otras técnicas no habían podido ser distinguidos (Katzir *et al.*, 1996).

Es así como se ha comprobado, en diversas especies, la complementariedad de todas las técnicas mencionadas anteriormente en el estudio global de la organización genética del germoplasma.

3.7.3. Longitud de Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados (AFLP)

Los AFLPs son un método muy sensible para la toma de huellas dactilares de ADN genómico dentro de cualquier organismo. Las aplicaciones de esta técnica en la agricultura van desde el análisis de los rasgos agronómicos, de diagnóstico, análisis de pedigrí, forense y herencia paterna, y puede ser utilizado como un sistema de huellas dactilares (Powell *et al.*, 1996).

Los AFLPs se basan en la amplificación selectiva de un subconjunto de los fragmentos de restricción genómica utilizando PCR. Las endonucleasas de restricción como MseI y EcoRI se utilizan para digerir el ADN antes de la amplificación, y el subsiguiente sitio de restricción es utilizado como un primer lugar de unión para la amplificación de PCR.

Estos fragmentos amplificados son analizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, desnaturalización que genera huellas dactilares que se comparan como polimorfismos. Estos polimorfismos son típicamente heredados en una moda genética Mendeliana, lo que permite su uso para la identificación y mapeo de las características genéticas.

3.7.4. Aplicaciones y usos comunes de los marcadores moleculares (Powell *et al.*, 1996)

- I. Puede ser utilizado para construir mapas genéticos.
- II. Cualquier aplicación para la toma de huellas dactilares de ADN.
- III. Análisis segregantes de todo el paquete de ADN.
- IV. Los fitomejoradores la utilizan para rastrear la herencia de características agronómicas.

3.7.5. Ventajas de los marcadores moleculares (Powell *et al.*, 1996)

- I. Por ensayo se detectan fragmentos de restricción.
- II. Se producen altos niveles de polimorfismos.
- III. Los Kits prefabricados están disponibles para su compra, y son fáciles de usar.

- IV. Los resultados son reproducibles y permanecen constante en el tiempo y entre laboratorios.
- V. El costo de los RFLPs y RAPDs es aceptable.
- VI. La metodología es rápida.
- VII. Los AFLPs tienen la capacidad de saturar el genoma para localizar polimorfismos.

3.8. Mapas genéticos

Los mapas de ligamiento son importantes en los trabajos de mejora genética debido a que muestran el orden y la localización de genes de una especie. La búsqueda de QTLs de interés para cualquier carácter requiere la construcción de un mapa genético saturado con muchos marcadores ligados y ordenados en diferentes grupos de ligamientos que garanticen la localización de genes deseables (Paterson *et al.*, 1991). De acuerdo con Lee (1995) los mapas completamente saturados facilitan información importante para la clonación posicional de genes, permiten la expansión directa del acervo genético de una especie a través del mapeo comparativo entre taxones y aceleran la identificación e incorporación de genes de interés en los cultivares aportando pistas importantes para entender la base biológica de caracteres complejos como los QTLs.

El orden y ubicación de los genes en los cromosomas de un mapa genético debe ser el mismo en el que están ordenados en el genoma, sin embargo las distancias entre los genes no necesariamente deben corresponder con las distancias físicas. Esto se debe a que los mapas genéticos se basan en el ligamiento, el cual puede variar según el fragmento de genoma que se analice, siendo las distancias genéticas proporcionalmente mayores con respecto a las físicas en zonas de mayor recombinación (eucromatina) o más cortas cuando la recombinación está restringida (regiones centroméricas y heterocromáticas). Aunado a esto la recombinación puede también variar según el genotipo, el sexo ó la especie (Monfort *et al.*, 2002).

CAPITULO IV. MATERIALES Y METODOS

El desarrollo de este estudio se realizó en dos etapas, la primera consistió en la determinación del contenido de taninos en 60 genotipos de haba. La segunda etapa fue la caracterización molecular del mismo material genético de haba, con la ayuda de marcadores RAPD e ISSR, desarrollados en el laboratorio de Calidad de Frijol del INIFAP.

4.1. Material vegetal

Las variedades de haba que se utilizaron fueron recolectadas en las regiones productoras de la especie pertenecientes a los estados de Puebla, Tlaxcala, Oaxaca y Guerrero (Figura 2).

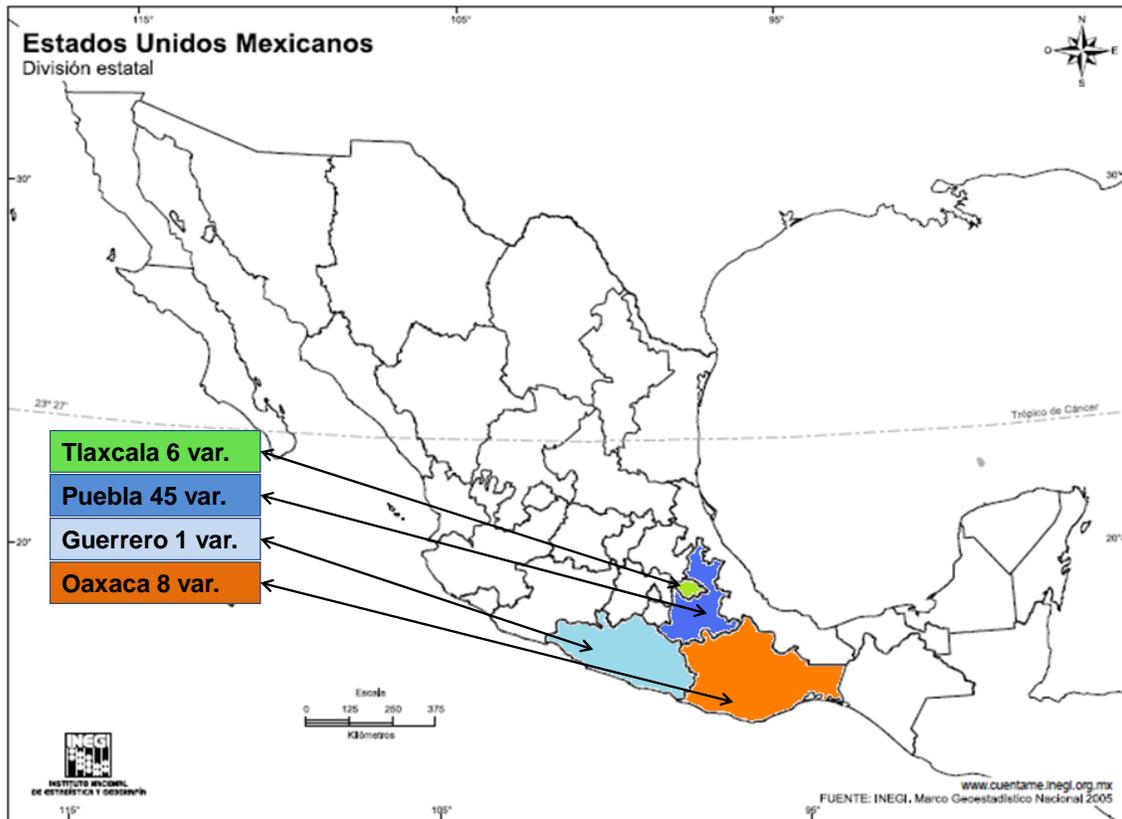


Figura 2. Ubicación de los estados donde fueron colectadas las variedades de haba utilizadas en la investigación.

4.1.1. Siembra en invernadero

Las 60 variedades fueron sembradas en macetas con capacidad para 6 Kg de suelo. En cada maceta se depositaron dos semillas a 3 cm de profundidad y después de la emergencia se dejó una plántula.

La distribución de las variedades fue bajo un diseño experimental completamente al azar, donde cada variedad tuvo 10 repeticiones generando un total de 600 macetas y cada una representó la unidad experimental de donde se derivó la información requerida.

Las variables de respuesta evaluadas fueron:

- I. Altura total de la planta (ATPL). Se midió la altura del tallo principal en la etapa de maduración fisiológica, mediante una regla metálica graduada. El dato se tomó desde la superficie del suelo hasta la máxima altura del tallo.
- II. Altura a la primera rama con flor (APRF). Se midió sobre el tallo principal desde el suelo hasta el nudo de la primera rama donde apareció la primera flor abierta.
- III. Altura a la primera rama con fruto (APRFR). Se midió sobre el tallo principal desde el suelo hasta el nudo de la primera rama donde apareció el primer fruto formado.
- IV. Caracteres de la vaina por planta. Se contó el número de vainas totales (NVT), número vainas buenas (NVB), definida como aquella que tuvo al menos una semilla formada, número de vainas malas o abortadas (NVM) que presentaron ausencia de semillas, peso seco de vainas totales (PSVT) referida a las vainas buenas y abortadas, peso seco de vainas buenas (PSVB) y peso seco de vainas malas o abortadas (PSVM).
- V. Caracteres de la semilla por planta. A partir de las vainas buenas, se contabilizó el total de semillas formadas (NST), posteriormente se separaron en semillas buenas y malas o abortadas y se registró la cantidad de semillas en cada grupo, en el texto se identifican como NSB y NSM respectivamente. Finalmente se obtuvo el peso del total de semillas formadas (PSST), semillas buenas (PSSB) y semillas malas (PSSM).

Las variables evaluadas en cuanto a la fenología de haba fueron:

- I. Edad a emergencia (EE) por muestra. Esta se midió en días desde la siembra hasta el día que apareció el gancho plumular.
- II. Edad a floración (EF) por muestra. Esta variable fue determinada como el número de días transcurridos desde el momento de la siembra hasta la aparición de la primera flor completamente abierta.
- III. Edad a fructificación (EFR) por muestra. Fue evaluada como el número de días transcurridos desde que se sembró hasta la aparición de la primera vaina formada.
- IV. Días a madurez fisiológica (DMFI) por muestra. Se contabilizaron los días desde la emergencia de plántulas hasta 90 % de madurez de las vainas por planta.

El peso de vainas y semillas por planta se registró con una balanza granataria Triple Beam Balance marca Ohaus.

4.2. Análisis de taninos

La cuantificación de taninos se efectuó con el método de Burns (1971), modificado por Maxon y Rooney (1972) y por Price *et al.* (1978), que consistió en lo siguiente:

4.2.1. Material biológico

El material utilizado fue el de las recolectas a las cuales se les estimó el contenido de taninos en la testa de las semillas pertenecientes a las 60 variedades de haba, la cual fue desprendida con un pelador de habas hasta juntar 5 g por muestra.

4.2.2. Reactivos

- I. Acido Clorhídrico
- II. Metanol
- III. Vainillina
- IV. Catequina

4.2.2.1. Agente cromogénico (AC)

- I. Se preparó una solución al 8 % de HCL (ácido clorhídrico) en Metanol.
- II. Se preparó una solución al 4 % de vainillina en metanol.
- III. Se mezclaron inmediatamente ambas soluciones en proporción 1:1, si la mezcla presenta color ámbar se descarta y se prepara nuevamente, hasta que adquiere un color transparente, estado que se considera lista para ser utilizada.

4.2.2.2. Solución estándar (SE)

Se pesaron 20 mg de catequina colocándose en un matraz aforado de 10 mL y se agregó metanol hasta la marca del aforo.

4.2.2.3. Curva estándar

Utilizando una micropipeta Labsystem 4500, se hicieron por triplicado y en el menor tiempo posible las diluciones siguientes que corresponden a 1.00, 0.50, 0.25, 0.125 y 0.0625 mg de catequina mL⁻¹ (Cuadro 6).

Cuadro 6. Diluciones para generar una curva estándar de catequina.

| mg de catequina | mL de solución estándar | mL de agente Cromogénico |
|-----------------|-------------------------|--------------------------|
| 1.00 | 0.500 | 4.500 |
| 0.50 | 0.2500 | 4.750 |
| 0.25 | 0.1250 | 4.875 |
| 0.125 | 0.0625 | 4.937 |
| 0.0625 | 0.0320 | 4.968 |
| 0.00 | Blanco | 5 mL de MeOH al 4 % |

Inmediatamente después de ser preparadas las diluciones se incubaron en baño maría BÜCHI Waterbath B-481 a 30 °C durante 20 min. Transcurrido este tiempo se retiraron del baño y se transfirieron a celdas de medición para determinar su absorbancia en el espectrofotómetro Marca JENWAY Modelo 6320-D Serie 2818 a 500 nm.

4.2.2.4. Preparación de las muestras

Por duplicado se pesaron 200 mg de material vegetal molido, el cual se puso en tubos de ensayo Kimax de 20 ml con tapa y se agregaron 10 mL de solución al 1 % de HCl en metanol, se taparon y se pusieron en un Agitador Orbital IKA Labortechnik KS250BS1 durante 20 min. Para la preparación del blanco solo se agregó la solución de HCl al 1%.

Transcurrido el tiempo la solución se filtró. Enseguida se tomaron dos alícuotas de 1 mL, colocando cada una en un tubo de ensayo, se agregaron 4 mL de AC incluyendo el blanco.

Los tubos fueron Incubados en baño maría por 20 min a 30 °C y se transfirieron a celdas de medición para determinar su absorbancia a 500 nm en el espectrofotómetro.

4.2.3. Ecuaciones para la estimación de taninos

La ecuación obtenida a partir de la curva estándar para el cálculo de los taninos es la siguiente:

$$X = \left(\frac{Y}{1.040} \right)$$

- I. X= mg de taninos (expresados en equivalentes de catequina= EC)
- II. Y= Absorbancia determinada con el espectrofotómetro
- III. b= Pendiente de la recta= 1.040 (constante)

Para el cálculo del contenido de taninos en 100 g de peso seco de la muestra se aplicó la siguiente fórmula.

$$X = \left(\left(\frac{Y}{1.040} \right) V \right) \left(\frac{100}{100-H} \right)$$

Donde:

- I. X= mg de taninos
- II. Y= Absorbancia determinada con el espectrofotómetro
- III. b = Pendiente de la recta igual a 1.040 (constante)

- IV. $V =$ Volumen de la solución para cada muestra = 10 mL
- V. $H =$ Porcentaje de humedad en el tejido vegetal de la muestra. Se tomó un 10%.
- VI. 100 = Gramos de peso seco de la muestra.

Se hicieron los cálculos para cada repetición y después se obtuvo el promedio de las cuatro repeticiones por colecta. También se calculó la desviación estándar mediante el programa Excel y se realizó un análisis de varianza.

4.3. Análisis de marcadores moleculares

Los análisis se realizaron en el laboratorio de Calidad de semillas de Frijol del INIFAP, consistió en la extracción de ADN de las diferentes variedades de haba y el desarrollo de las técnicas RAPDs e ISSR utilizando diferentes iniciadores.

4.3.1. Extracción de ADN

Fue realizada en una muestra de hojas apicales tiernas provenientes de plántulas sembradas en invernadero con dos repeticiones cada muestra.

Se pesaron 150 mg de hoja de haba tierna (Figura 3a) y se colocaron en tubos eppendorf (Figura 3b), a los cuales se agregó nitrógeno líquido para moler la muestra con pistilos y un taladro y evitar la desnaturalización del ADN (Figura 3c).

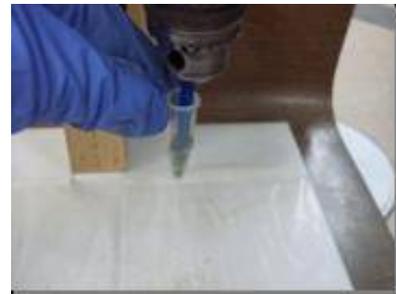


Figura 3a. Peso de hojas de haba. Figura 3b. Acomodo de las muestras. Figura 3c. Molido de las mismas.

Se adicionaron 700 µl de buffer de extracción a las muestras (Tris 100 mM pH 8, EDTA 20 mM pH 8, NaCl 1.0 M, β-mercaptoetanol 1% PVP, 1%)+ 50 µl SDS y se incubaron durante 20 min a 65 °C, transcurrido el tiempo, las muestras fueron extraídas con una micropipeta a un tubo eppendorf, se precipitaron con 600 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se mezclaron por inversión durante 15 min.

Se centrifugaron por 10 min a 13000 revoluciones por minuto (rpm) en una Centrífuga Eppendorf 5415D, el sobrenadante se vació con una micropipeta y una punta biselada a un tubo con 700 µl de isopropanol preenfriado y se incubó durante 15 min a -20°C, después se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm, se descartó el sobrenadante y se invirtió el tubo para secar la pastilla, para evitar la pérdida de ADN; se vaciaron los tubos en alcohol y el ADN se recuperó con una micropipeta y una punta estéril, después se agregaron 100 µl de buffer TE (Tris HCl 50 mM a pH 8) y 4 µl de RNasa (10 mg/mL) para desnaturalizar los residuos de RNA y se incubaron a 37 °C por 15 min en una incubadora.

Posteriormente las muestras se precipitaron con 1 ml de metanol (EtOH) al 100% frío y se dejaron reposar por 15 min, después se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se secó la pastilla, la cual se lavó con 1 mL EtOH al 70% frío, el ADN fue suspendido en 100 µl de buffer TE con pH 8 (Tris 10 mM) y se almacenó a 4 °C en un frigorífico.

4.3.2. Estimación de la calidad del ADN genómico

Después de la extracción y limpieza respectiva del ADN, se procedió a la cuantificación y estimación de su pureza en cada muestra, utilizando un Espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo Lambda Bio. Las lecturas se realizaron a 260 y 280 nm (Sambrook *et al.*, 1989)

La relación entre la lectura de absorbancia a 260/280 nm aportó la estimación de la pureza de los ácidos nucleicos.

4.3.3. Determinación de la cantidad del ADN

Para verificar la calidad del ADN, lo cual se asocia con la integridad de la cadena que se logra durante el proceso de extracción, se preparó un gel de agarosa al 1.2 % disuelta en TBE 1X y 0.20% de bromuro de etidio en una Cámara de Electroforesis Horizontal de 12 x 24 cm Modelo SUNRISE TM 96 de Life Technologies. En cada pozo se depositó 5 µL de la dilución de ADN y 2 µL de colorante de carga (Azul de Bromofenol). En los extremos del gel se colocaron 5 µL del marcador fago λ Hind III. La electroforesis se realizó a 70 v. Finalizado el corrimiento de las muestras, se determinó la calidad del ADN la cual se visualizó con luz ultravioleta en un transiluminador Upland modelo Ts-20.

La concentración de ADN se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de ADN } \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1} = (\text{Densidad Óptica a 260} \times \text{Factor de dilución} \times 50 \text{ mg/ml})/1000$$

El ADN utilizado para PCR se diluyó de acuerdo a la cantidad de ADN obtenida tras la dilución con Buffer TE a pH 8 (Tris 10 mM), para alcanzar una concentración de 10 ng/µL.

4.3.4. Establecimiento de las técnicas RAPD e ISSR

4.3.4.1. Iniciadores RAPDs

La longitud de los iniciadores empleados fue de 10 pares de bases (pb). La mezcla de reacción se preparó con 3.2 µL de ADN genómico diluido hasta un volumen final de 10 ng/µL. Los componentes de la mezcla de reacción fueron agua bidestilada (ddH₂O), Buffer 10x, cloruro de magnesio 30 mM (MgCl₂), DNTPs (2.5 cada uno), iniciador 10 mM y 0.14 unidades de Taq ADN polimerasa. Las condiciones de amplificación (Cuadro 7) estuvieron basadas en la metodología propuesta por Williams *et al.* (1990) modificada por Torres *et al.* (1993). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo con un termociclador TC-512 Techne. Se analizaron un total de 34 iniciadores pertenecientes a la familia Operon Invitrogen custom primers designados como OP.

Cuadro 7. Condiciones de amplificación para los marcadores RAPDs.

| Fase | Temperatura (°C) | Tiempo (min.) | Ciclos |
|--------------------------|-------------------------|----------------------|---------------|
| Desnaturalización | 94 | 0.2 | |
| Hibridación | 36 | 1 | |
| Extensión | 72 | 1 | 40 |
| Extensión final | 72 | 8 | |
| Enfriamiento | 4 | A | |

A= Tiempo indefinido que tarda el termociclador en llegar a 4 °C.

4.3.4.2. Electroforesis

La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.2 % disuelta en TBE 1X y 0.20% de bromuro de etidio y se corrió a 70 V durante 1 hora y 15 minutos, en una Cámara de Electroforesis Horizontal de 12 x 24 cm modelo SUNRISE TM 96 de Life Technologies. En cada pozo se colocaron 20 µL de la dilución de ADN más 2 µL de colorante de carga (azul de bromofenol). Finalizado el corrimiento de las muestras, se observaron las bandas con luz ultravioleta en un Transiluminador Upland modelo Ts-20, y se tomaron las fotografías correspondientes con el Fotodocumentador Kodak gel logic 100.

4.3.4.3. Microsatélites (SSR)

Se analizaron diez microsatélites cuyas características específicas se describen en el Cuadro 8. La mezcla de reacción para la amplificación del ADN se realizó de acuerdo con el protocolo de Macas *et al.* (1993), que consistió en preparar una mezcla de reacción con 4 µl de ADN genómico diluido hasta un volumen final de 10 ng/µl. Los componentes de la mezcla de reacción fueron agua bidestilada (ddH₂O), buffer 10x, Cloruro de Magnesio 30 mM (MgCl₂), DNTPs (2.5 cada uno), primer 20 mM y 0.12 unidades de Taq ADN polimerasa. Las condiciones de amplificación (Cuadro 9) difieren en la temperatura de hibridación la cual disminuye unos grados cada ciclo, hasta estabilizarse a un número de ciclos y temperatura específicos para cada microsatélite. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo con un Termociclador TC-512 TECHNE. Se analizaron un total de 10 iniciadores.

La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.2 % disuelta en TBE 1X y 0.20% de bromuro de etidio y se corrió a 70 V durante 1 h, en una Cámara de Electroforesis Horizontal de 12 x 24

cm Modelo SUNRISE TM 96 de Life Technologies (Figura 4). En cada pozo se colocaron 20 μ L de la dilución de ADN más 2 μ L de colorante de carga (azul de bromofenol). Finalizado el corrimiento de las muestras, se revelaron las bandas con luz ultravioleta en un Transiluminador Upland modelo Ts-20, y se tomaron las fotografías correspondientes con el Fotodocumentador Kodak gel logic 100.



Figura 4. Muestras de ADN de las variedades de haba cargadas en un gel de agarosa.

Cuadro 8. Características de los microsátélites analizados en las 60 variedades de haba.

| SSR | TH (°C) | Ciclos | Secuencias de los iniciadores |
|----------|---------|--------|--|
| GA4 | 68-62 | 23 | 5'GAACTAAGGTGTACACGCGGG3' F 5'GGGGGGTAGATCTTGTTTTTTCC3' R |
| GAI18 | 63-51 | 26 | 5'GTTATTATTATGTACGCGCGTGC3' F 5'GAATAAGCAGAAACGCGACGT3' R |
| GAI30 | 65-55 | 25 | 5'GGAAAATATGATGAAAAAGCCGC3' F 5'GAGTCGATATCACGTCGGAGG3' R |
| GAI59 | 66-58 | 35 | 5'GTAATGTGGCCCAATCCAATT3' F 5'GTGAATTGTTGAAGATGGATGAA3' R |
| JFI-AG3 | 67-55 | 35 | 5'ATGCTGAGGATGCAGGATCGA3' F 5'TAATTTGTTGGTCTCAGTGC3' R |
| GATS 11B | 68-62 | 23 | 5'CCCACCATTGGTGCTAGTG3' F 5'AGCGCAATGCTACTCGAAAT3' R |
| BM 48 | 65-55 | 25 | 5'GCCGTTGAGCTGGAGAGCA3' F 5'CCTTCTTCTTGAGCCCGCTG3' R |
| BM 151 | 65-55 | 25 | 5'CAACAAGAAAGACCTCCT3' F 5'TTATGTATTAGACCACATTACTTCC3' R |
| BM 155 | 65-55 | 25 | 5'GTTTCATGTTTGTGACAGTTCA3' F 5'CAGAAGTTAGTGTGGTTTGATACA3' R |
| BM 159 | 65-55 | 25 | 5'GGTGCTGTTGCTGCTGTTAT3' F 5'GGGAGATGTGGTAAGATAATGAAA3' R |

TH= Temperatura de hibridación; F= Forward; R= Reverse

Cuadro 9. Condiciones de amplificación para los microsátélites.

| Fase | Temperatura (°C) | Tiempo (min) |
|--------------------------|-------------------------|---------------------|
| Pre calentamiento | 95 | 3 |
| Desnaturalización | 95 | 0.30 |
| Hibridación | ver cuadro 8 | 0.50 |
| Extensión | 72 | 1 |
| Extensión final | 72 | 10 |
| Enfriamiento | 4 | A |

A= Tiempo indefinido que tarda el termociclador en llegar a 4 °C.

4.3.4.4. Análisis de datos

Las bandas reveladas para cada genotipo y por cada iniciador fueron ordenadas numéricamente y se registraron en una base de datos mediante un código binario (ausencia/presencia) para cada marcador molecular empleado (RAPD e ISSR). Con el total de bandas amplificadas por cada marcador se calculó el porcentaje de polimorfismo con base a la siguiente fórmula: número de bandas polimórficas/número de bandas totales reveladas por iniciador * 100. Las bases de datos fueron empleadas para realizar los análisis de conglomerados de agrupación jerárquica (SAHN) usando el método de ligamiento promedio (UPGMA) con la ayuda del paquete estadístico NTSYSpc 2.2. De esta manera se generaron los dendrogramas con el programa Tree del NTSYS para mostrar las distancias genéticas entre los genotipos. El índice de similitud fue calculado usando el coeficiente de Dice (Dice, 1945).

CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Taninos

5.1.1. Contenido de taninos en las variedades de habas

El contenido de taninos en la testa de las colectas varió desde 2.6% hasta 11.2% con un promedio de 6.6 % (Cuadro 10). En este rango de variación y con base al análisis de varianza se detectaron diferencias significativas entre las colectas de haba en la cantidad de taninos (Cuadro 10). Mediante la aplicación de la prueba de Tukey se identificaron las variedades con menor contenido de taninos señaladas como V-44 (2.6%) y V-75 (2.7%), las de mayor cantidad fueron la V-5 y V-12 con misma cantidad (10.6%) y la V-72 (11.2%). En la testa se ha reportado 2.8% y en los cotiledones 0.5% en haba cochinera ya sea fertilizada con nitrógeno o sin fertilizante (Guadarrama *et al.*, 2007). Las variedades de haba con alto y bajo contenido serán seleccionadas como parentales contrastantes y realizar cruzamientos entre ellas. La población segregante será monitoreada con marcadores moleculares para localizar las regiones del genoma (QTLs) implicadas en el contenido de taninos de la especie.

Cuadro 10. Contenido de taninos en variedades de haba. Medias de variedades con la misma letra no son significativamente diferentes.

| | Variedad | Porcentaje de Taninos |
|---|----------|-----------------------|
| Variedades con poco contenido de Taninos | V-44 | 2.6 f |
| | V-75 | 2.7 f |
| | V-181 | 3.4 e |
| | V-52 | 3.9 de |
| | V-53 | 4.0 d |
| Variedades con intermedio contenido de Taninos | V-46 | 6.1 stu |
| | V-51 | 6.2 stu |
| | V-71 | 6.2 stu |
| | V-281 | 6.3 rst |
| | V-36 | 6.5 qrs |
| Variedades con mayor contenido de Taninos | V-68 | 9.7 bc |
| | V-1 | 9.9 b |
| | V-5 | 10.6 a |
| | V-12 | 10.6 a |
| | V-72 | 11.2 a |

Pro F

**

**=P ≤0.0001

La variación en este componente, considerado antinutritivo cuando su contenido es abundante, forma parte de los caracteres en los que es posible realizar selección de variedades con alto y bajo contenido según la demanda o el uso que se haga de ella. Dicha determinación de taninos es de las primeras que se lleva a cabo en las habas cultivadas por agricultores en los Valles Altos del país, solamente se han realizado estudios de evaluación de variedades a nivel morfológico y agronómico (Díaz-Ruiz, 2009) con el objetivo central de identificar variedades con alto rendimiento de grano.

Las variedades con alta cantidad de taninos deben ser conservadas para preservar los genes ligados a dicho carácter en el entendido que tienden a presentar mayor resistencia a las enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus e insectos (Startler, 1970). Sin embargo esta característica, presenta correlación negativa con el contenido de proteína y en general con la calidad nutricional (Deshpande *et al.*, 1986), en este caso es necesario buscar plantas que presenten equilibrio entre los dos caracteres.

En un estudio realizado por Guadarrama *et al.* (2007) sobre el efecto de la fertilización nitrogenada (100 Kg de N) en el cultivar de haba cochinera y su relación con el contenido de taninos encontraron que a la madures fisiológica, la concentración de taninos en el fruto de haba no muestra cambios significativos por efecto de dosis de nitrógeno. Sin embargo, Jansman *et al.* (1993) y Harinder *et al.* (1997), señalan que el nitrógeno reduce la concentración de taninos y lo atribuyen a diferencias en los cultivares utilizados y condiciones ambientales en que éstos se desarrollaron. En el caso de las habas analizadas cultivadas por los haberos no son fertilizadas comúnmente a excepción de algunos productores que aplican dosis bajas de fertilizantes nitrogenados, por lo tanto las diferencias encontradas en el presente estudio en contenido de taninos está más influenciado por los cultivares y el ambiente.

5.1.2. Contenido de taninos en los distintos colores de testa

En cuanto a la relación entre el color de testa y el contenido de taninos se encontró que las habas parraleñas presentaron 3.9 % de taninos en promedio en un rango de 2.7 a 5.7%. En habas con testa roja se estimó 4.3% de taninos y un rango de 2.6 a 5.4%. Las testas color crema presentaron entre 5.4 a 10.6% de taninos con un promedio igual a 6.6%, seguidas de las de color marrón con

un promedio de 6.9% en un rango de 5.7 a 8.1%. Las habas con testa amarilla fueron las de mayor contenido de taninos con un promedio de 7% y un rango de 3.9 a 11.2% (Figura 5).

La tendencia encontrada en las cantidades promedios de taninos es similar a lo reportado por otros investigadores (Cabrera y Martín, 1986) donde los colores de testa crema y rojo tienden a presentar bajos contenidos de taninos. Esto está relacionado también con el color de las flores, las habas con flores blancas son las que tienen menos cantidades de taninos. Al respecto se han localizado dos genes (*zt-1* y *zt-2*) implicados en la cantidad de dicho componente antinutritivo y en la expresión de flores blancas en las plantas de habas (Picard, 1976).

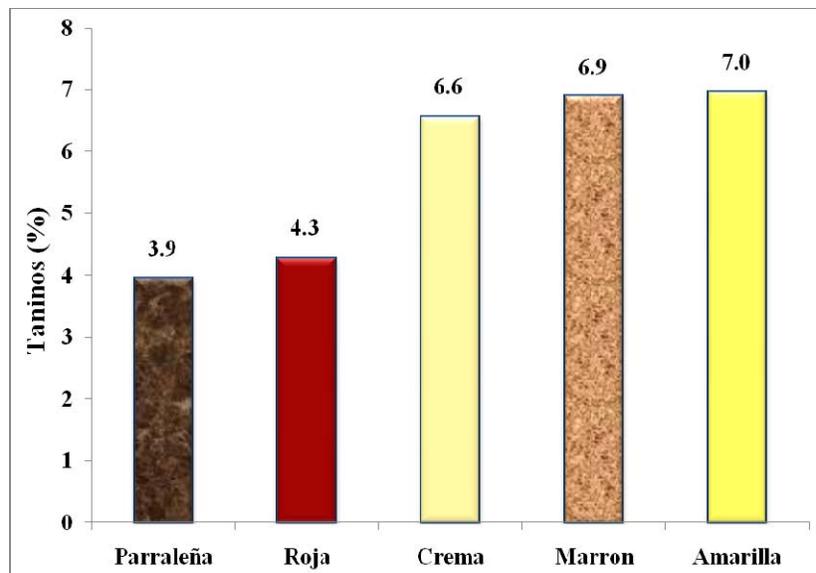


Figura 5. Diferencias en cuanto al contenido de taninos en relación al color de la testa de haba.

La variabilidad encontrada en cada rango de colores de testa abre la posibilidad de identificar poblaciones con bajas cantidades de taninos, por ejemplo en las parraleñas, rojas y amarillas que presentaron variedades con contenidos bajos de taninos. En el caso de las habas con testa amarilla, donde se obtuvo el rango más amplio y las poblaciones con mayor contenido de taninos es interesante debido a que es el color de mayor demanda en el mercado. Las poblaciones identificadas con menor y mayor cantidad de taninos serán seleccionadas como progenitores para iniciar un programa de mejoramiento genético auxiliado con marcadores moleculares con la finalidad de formar variedades que tengan mínimas cantidades de dicho componente

antinutritivo y de forma indirecta mejorar la calidad nutricional. Al respecto se han identificado marcadores SCAR ligados al bajo contenido de taninos, específicamente al gen *zt-2* (Gutierrez *et al.*, 2008). Este conocimiento es factible aplicarlo y buscar la posibilidad de encontrar mayor número de marcadores universales partiendo de los más comunes, como son los RAPDs, y transformarlos en SCAR como se ha realizado en otros estudios con marcadores moleculares para otros caracteres como la búsqueda de resistencia a *Ascochyta* y taninos en la especie de Vicia (Díaz-Ruiz *et al.*, 2009, Gutierrez *et al.*, 2008).

5.1.3. Correlaciones entre contenido de taninos y caracteres agronómicos en haba

Al realizar las correlaciones entre el contenido de taninos y caracteres de interés agronómico tales como: edad a floración, edad a fructificación, número de vainas totales, buenas y malas, peso de vainas totales, buenas y malas, número de semillas totales buenas y malas, peso de semillas totales buenas y malas (Cuadro 11), no se encontró significancia entre dichas correlaciones, lo cual indica que el contenido de taninos es independiente a la expresión de estos caracteres agronómicos.

La asociación de cantidad de taninos con caracteres morfológicos o agronómicos son escasos solo se ha reportado correlación entre dicho carácter y el color de flor blanca (Cabrera y Martín, 1986), de igual manera se ha determinado asociación con el color del hilum de la semilla, donde los colores oscuros tienen menos taninos.

Cuadro 11. Correlaciones entre el contenido de taninos y diferentes caracteres agronómicos.

| | Taninos | | Taninos |
|-------------|---------|------|---------|
| EF | -0,18 | PSVM | 0,00 |
| EFR | -0,16 | NST | -0,05 |
| NVT | 0,08 | NSB | -0,06 |
| NVB | -0,01 | NSM | -0,01 |
| NVM | -0,03 | PSST | -0,01 |
| PSVT | -0,03 | PSSB | -0,02 |
| PSVB | 0,00 | PSSM | 0,16 |

EF= edad a floración, EFR= edad a fructificación, NVT= número de vainas totales, NVB= número da vainas buenas, NVM= número de vainas malas, PSVT= peso de vainas totales, PSVB= peso de vainas buenas, PSVM= peso de vainas malas, NST= número de semillas totales, NSB= número de semillas buenas, NSM= número de semillas malas, PSST= peso de semillas totales, PSSB= peso de semillas buenas, PSSM= peso de semillas malas.

5.2. Caracterización molecular

5.2.1. Calidad del ADN

El polimorfismo intraespecie de *Vicia faba* L., se estimó mediante las técnicas RAPDs y microsatélites.

El ADN obtenido en cada una de las muestras de 60 cultivares criollos de diferentes regiones de la republica Mexicana fue de buena calidad, libre de residuos de proteínas y sin ADN fragmentado (Figura 6). El índice de absorbancia (280/260 nm) estuvo entre 1.8 y 2.0. El ADN de buena calidad permitió una amplificación satisfactoria de cada una de las muestras. La cantidad obtenida de ADN proveniente de 150 mg de hoja tierna, fue suficiente para realizar los análisis con las técnicas RAPDs y microsatélites ya que las bandas se definieron bien.

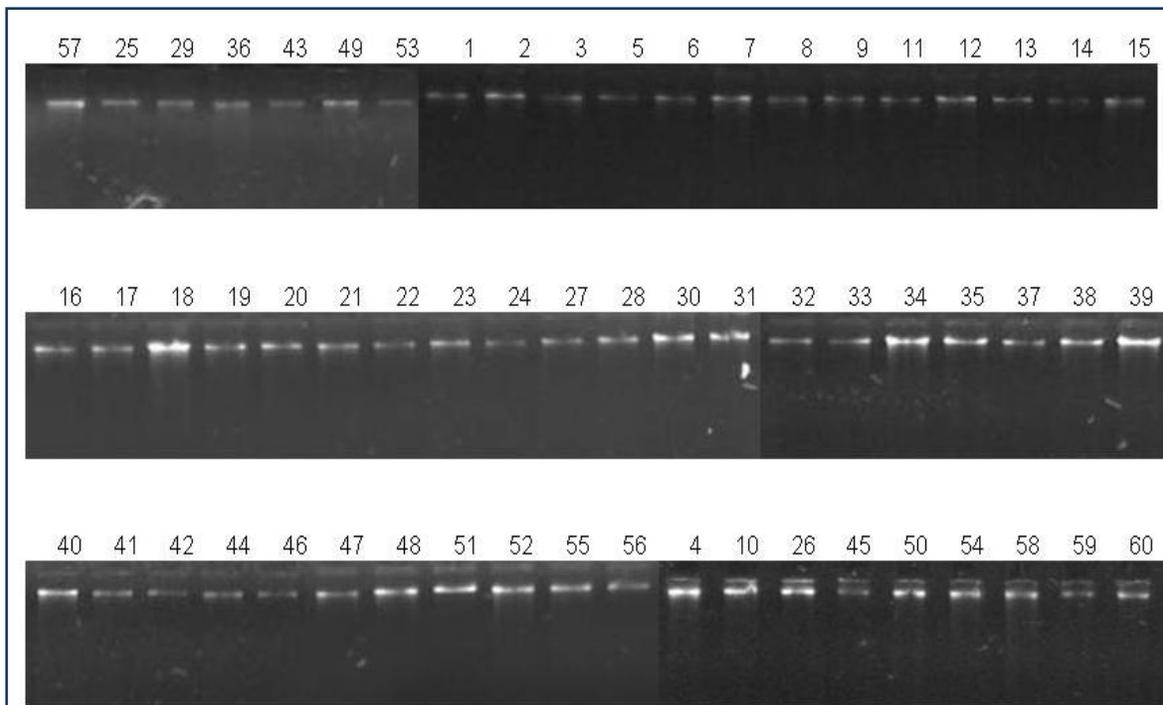


Figura 6. Calidad del ADN obtenido de hojas tiernas de plántulas de los genotipos de *Vicia faba* L. bajo estudio.

5.2.2. Selección de iniciadores RAPDs e ISSR

El uso de marcadores moleculares, como los RAPDs y los ISSRs, para caracterizar especies vegetales, que resultan difíciles de separar mediante el uso de marcadores morfológicos, ha resultado una herramienta muy útil por su facilidad de uso, repetibilidad, ausencia de elementos radiactivos durante el análisis y la gran cantidad de polimorfismos que se obtiene, en comparación con RFLPs o isoenzimas (Irwin *et al.*, 1998). En este estudio, la fidelidad de los marcadores utilizados se comprobó al no encontrar variaciones en el análisis de los loci provenientes de PCRs y extracciones de ADN repetidas.

Los marcadores RAPDs fueron eficientes para detectar polimorfismos en esta especie. Se evaluaron inicialmente 34 iniciadores en los 60 genotipos de haba de los cuales 16 amplificaron y solamente seis de ellos se seleccionaron por presentar polimorfismo (OPA-14, OPAC-20, OPH-12, OPM-05, OPN-13 y OPF-13), los iniciadores elegidos amplificaron un total de 24 bandas, de las cuales 16 fueron polimórficas, esto representa un 66.6% de polimorfismo (Figura 7). Estos iniciadores mostraron la mejor definición y reproducibilidad de las bandas de ADN que fueron leídas como presencia y ausencia. En el caso de los microsatélites se evaluaron 10, los cuales amplificaron pero no presentaron polimorfismo (Figura 8). Por lo que no se incluyeron en el análisis de diversidad. Sin embargo se buscara polimorfismo con enzimas de restricción en una futura investigación.

| | | | | | | | | | | | | | |
|----------|-----|--------|--------|---------|---------|--------|--------|---|----|----|----|----|----|
| pozo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| muestra | | 9 | 24 | 9 | 24 | 9 | 24 | 9 | 24 | 9 | 24 | 9 | 24 |
| marcador | P/M | OPA-04 | OPA-14 | OPAC-20 | OPAE-19 | OPH-12 | OPM-05 | | | | | | |

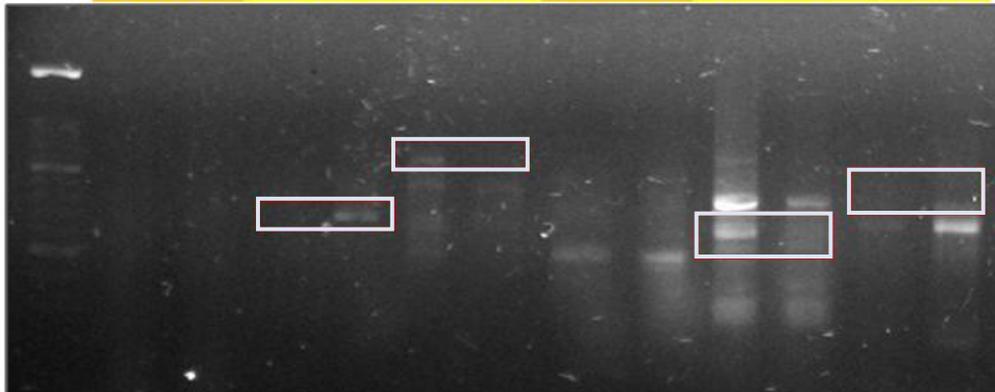


Figura 7. Fragmentos de ADN amplificados con los iniciadores RAPDs en dos muestras de haba para detectar polimorfismos.

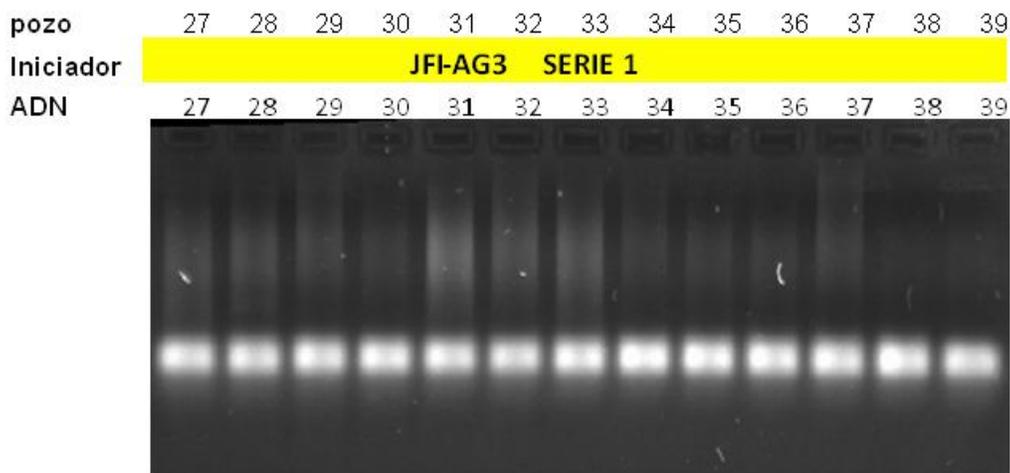


Figura 8. Fragmentos de ADN amplificados con los iniciadores microsatélites en muestras de haba para detectar polimorfismos.

5.2.3. Diversidad de cultivares de haba

Se encontró variabilidad entre poblaciones de haba cultivadas por agricultores, lo cual se vio reflejado en el polimorfismo detectado con los RAPDs (anexo 2) que se representan en el dendrograma de la Figura 9.

Se definieron en total 9 grupos con un índice de Dice de 0.90, 4 grupos estuvieron integrados por una sola variedad. El grupo 1 con la V1 la cual es una variedad de ciclo intermedio, con una concentración de 9.9 % de taninos y fue colectada en Puebla, el grupo 3 con la V33, es una variedad precoz con una concentración de 8.1 % de taninos, y fue la que presentó la altura menor (27 cm) de todas las variedades y pertenece también a Puebla, el grupo 6 con la V8 es una variedad de ciclo intermedio con una concentración de 6.9 % de taninos, perteneciente al estado de Tlaxcala, y el grupo 9 con la V70 es una variedad de ciclo intermedio con una concentración de 5.7 % de taninos y fue la que presentó el mayor número de vainas buenas, pertenece al estado de Oaxaca. Se formaron 2 grupos integrados con 2 variedades, el grupo 8 con las variedades V20 y V47, el grupo 5 con las variedades, V281 y V288, otro grupo con 3 variedades, el grupo 7 con las variedades, V36, V41 y V71, el grupo 4 quedó integrado con las variedades, V53, V54, V55 y V56, y por ultimo el grupo 2 considerado el mas grande con 45 variedades (V3, V31, V51, V52, V9, V15, V43, V12, V49, V35, V5, V18, V24, V61, V42, V11, V72, V13, V19, V44, V50, V46, V34, V57, V96, V73, V146, V181, V66, V199, V94, V69, V74, V10, V59, V93, V62,

V58, V65, V95, V22, V6, V60, V75 y V68). Los coeficientes de similitud y distancia son estimadores cuantitativos que describen el grado de asociación o semejanza entre dos poblaciones, expresado en valor numérico, entre 0 y 1.

En el grupo 2 se identifican 9 subgrupos con características similares entre ellos, lo que nos indica que hay similitud alta y en los cuales se integran de 2 a 5 variedades, el primer subgrupo está integrado por las variedades V31, V51 y V52, el segundo subgrupo por las variedades V15 y V43, el tercer subgrupo por las variedades, V12 y V49, el cuarto subgrupo por las variedades, V18 V24 y V61, el quinto subgrupo por las variedades, V13, V19, V44 y V50, el sexto subgrupo por las variedades, V57, V96, V73, V146, y V181, el séptimo subgrupo por las variedades, V199 y V94, el octavo subgrupo por las variedades, V69 y V74, y el noveno subgrupo por las variedades, V59, V93 y V62.

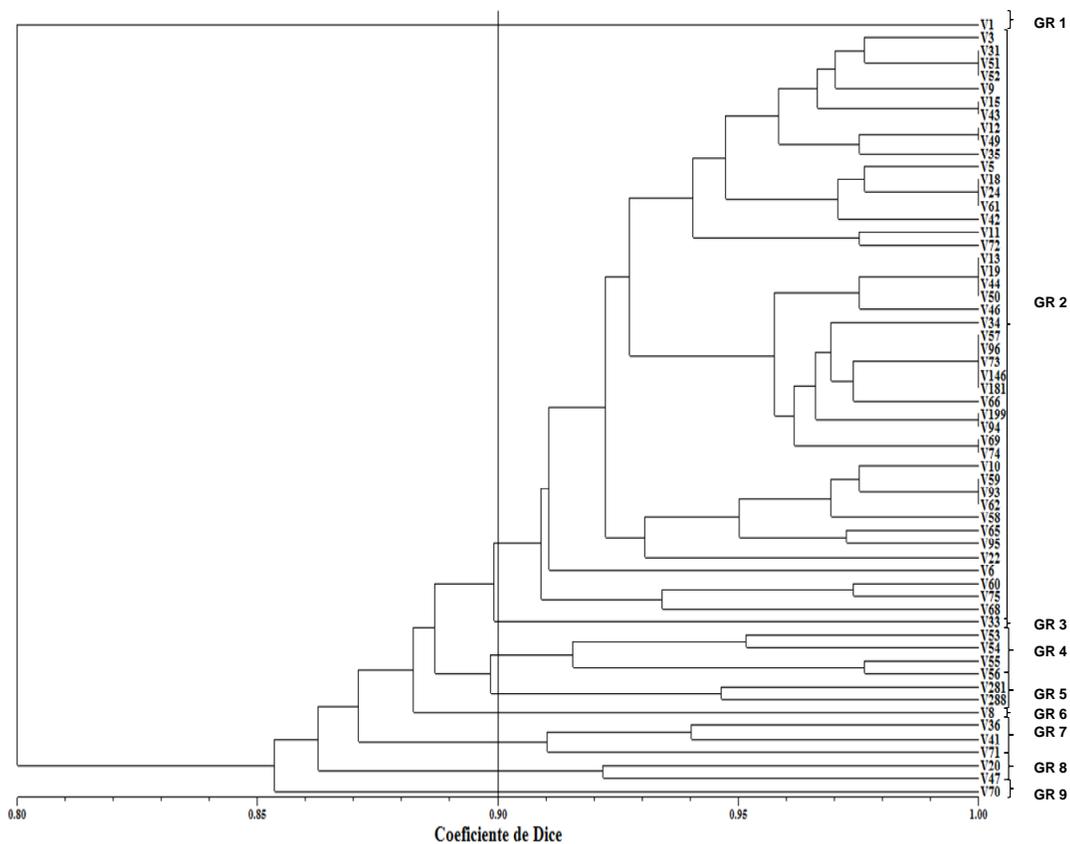


Figura 9. Análisis de agrupamiento con el algoritmo UPGMA de 60 genotipos de *Vicia faba* L., basado en una matriz de similitud genética construida a partir del coeficiente de Dice.

El origen geográfico de las colectas no se asoció con la agrupación en el dendrograma, este estudio es un primer acercamiento al conocimiento de la diversidad genética entre genotipos cultivados de haba en México y se demostró que la técnica RAPDs empleada es útil para evaluar la diversidad genética a nivel de variedades. En términos generales con los marcadores RAPDs se evidenció una amplia diversidad genética (Figura 9), distribuida en las zonas en las que se cultiva el haba en el país. Los cultivares que más variabilidad están aportando al grupo de genotipos estudiados son la V1, la V8, la V33 y la V70 las cuales se separaron totalmente de los demás grupos y pertenecen a diferentes estados.

Es importante mencionar que el haba es una planta parcialmente alógama, lo cual es favorecido por la polinización cruzada y por lo tanto el flujo de genes entre diferentes genotipos, genera altos índices de diversidad. Morillo *et al.*, (2005), en su estudio en mora (*Rubus* spp.), argumenta que el polimorfismo genético, puede estar asociado con la naturaleza alógama de la especie, la cual tiende a favorecer la conservación de un alto porcentaje de heterocigotos, igualmente Bonilla *et al.*, (2008), atribuye la alta diversidad encontrada en su estudio y comparada con otras investigaciones, a la alogamia de la *Physalis peruviana* L.

Los resultados presentados en este estudio se pueden asumir como una visión preliminar de la diversidad que presentan los cultivos de la haba en las principales zonas productoras de México (Puebla, Guerrero, Tlaxcala, Oaxaca y México), en donde se encontró una amplia diversidad genética, de la cual se podría disponer para futuros programas de mejoramiento genético.

Para desarrollar una estrategia de mejoramiento genético con miras a tener materiales seleccionados con características morfológicas o agronómicas de interés, es necesario evaluar la diversidad posible, buscando características de importancia para los productores como el encontrar variedades con alto rendimiento y bajo contenido de compuestos antinutritivos como los taninos. En el caso de las habas a los taninos se les considera sustancias antinutritivas.

En dosis altas los taninos limitan la absorción de algunos nutrientes como el hierro y proteínas, aunque actualmente los taninos de otras especies se consideran antioxidantes por su capacidad de eliminar los radicales libres, como son los taninos del vino tinto, a los cuales se les atribuyen efectos benéficos para la salud.

La técnica RAPDs permitió evidenciar la diversidad molecular de las habas cultivadas en los valles altos del país, dicha técnica ha estado siendo utilizada de manera común por los fitomejoradores de plantas para identificar la variación genética en otras especies vegetales de variedades silvestres, variedades comerciales y accesiones de una especie determinada (Anthony *et al.*, 2001). En adición a las bondades de estos marcadores, su desempeño como generadores de gran cantidad de polimorfismos, en este trabajo, ha sido aceptable.

5.3. Propuesta estratégica

Se plantea aprovechar la diversidad de las habas cultivadas por los productores en relación a la calidad de la semilla, respecto al potencial nutrimental y de adaptación a los diferentes ambientes, asimismo, conservar la diversidad de materiales y propiciar la producción para el aprovechamiento en la alimentación humana.

Al respecto el haba es y seguirá siendo un cultivo importante en la alimentación humana y en la integración de los agroecosistemas campesinos. Por ello, resulta importante implementar acciones encaminadas a la conservación, producción y transformación del cultivo, para contribuir a la seguridad alimentaria. La propuesta estratégica se describe a continuación:

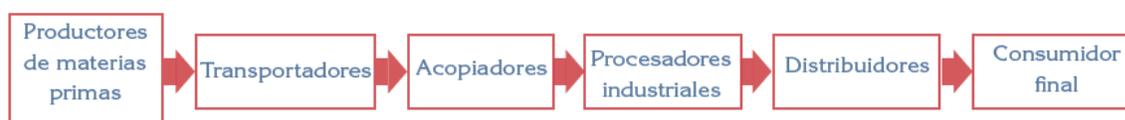
5.3.1. Acciones estratégicas

Para que la producción de haba sea atractiva a los productores, y realmente vean reflejados los beneficios alimentarios y económicos, debe abrirse un proceso a través del “enfoque de cadena participativa” como se plantea en la Figura 10.

La cadena productiva es un concepto que proviene de la escuela de la planeación estratégica (Beckerman y Cataife, 2001). Según esta escuela, la competitividad de una empresa se explica no solo a partir de sus características internas a nivel organizacional o micro, sino que también está determinada por factores externos asociados a su entorno. En tal sentido, las relaciones con proveedores, el Estado, los clientes y los distribuidores, entre otros, generan estímulos y permiten sinergias que facilitan la creación de ventajas competitivas.

Así, la cadena productiva puede definirse como “un conjunto estructurado de procesos de producción que tiene en común un mismo mercado y en el que las características tecnoproductivas de cada eslabón afectan la eficiencia y productividad de la producción en su conjunto”. De esta manera, la cadena productiva podría caracterizarse como el conjunto de firmas integradas alrededor de la producción de un bien o servicio y que van desde los productores de materias primas hasta el consumidor final (Figura 10).

Figura 10. Esquema de una cadena productiva.



El proceso de transferencia de nuevas tecnologías debe seguir un camino que va desde la evaluación del manejo actual de los cultivos por los productores hasta la entrega de las alternativas tecnológicas apropiadas para cada tipo de productor. El estudio de los sistemas de producción agrícola debe permitir identificar los factores limitantes a la introducción de nuevas tecnologías y las causas de la resistencia al cambio (inseguridad económica, dificultad en el uso de nuevos métodos, etc.).

En nuestro caso nos enfocamos en fortalecer el primer eslabón de la siguiente manera:

5.3.2. Investigación

La investigación para generar nuevas tecnologías que sean de interés y puedan ser aprovechadas por los productores de haba, la identificación de variedades con bajo contenido de taninos y una mayor cantidad de proteína disponible para los consumidores, así como el generar conocimientos de la diversidad de haba a nivel molecular, estará a cargo de las Instituciones de Investigación, como el Colegio de Postgraduados (CP), Institutos Tecnológicos y otras con interés en el tema (Figura 11).

5.3.3. Instituciones de apoyo

Para los apoyos económicos y equipamiento hacia los productores así como la capacitación mediante parcelas demostrativas, módulos demostrativos o dando asesoría técnica sobre aspectos muy precisos, estaría a cargo de las instituciones de servicio como son:

La Secretaría de Desarrollo Rural (SDR) del Estado de Puebla la cual plantea generar condiciones de competitividad que aumenten la rentabilidad del sector rural, con un incremento de la participación de los productos y servicios poblanos en el mercado nacional e internacional.

Las Fundaciones Produce creadas en 1996 por iniciativa de los Gobiernos Federal y Estatal, a través del Subprograma de Investigación y Transferencia de Tecnología de la Alianza para el Campo.

La visión de la Fundación Produce consiste en que esta es una organización capaz y exitosa en la generación de innovación tecnológica en beneficio de los actores de las cadenas agroindustriales en el Estado con el fin de:

- I. Consolidar un modelo sólido que apoye la generación y transferencia de las innovaciones tecnológicas, generadas para el cultivo de haba.
- II. Consolidar la agenda tecnológica, entre la demanda de los usuarios y los oferentes centros de investigación, referentes al cultivo de haba.
- III. Impulsar el sistema de investigación y transferencia de tecnología, en haba (Cofupro, 2010).

5.3.4. Las organizaciones de productores

Las organizaciones sociales de productores de haba, deben fortalecer el proceso de producción primaria. Su función debe ser plantear proyectos conjuntos y la gestión de los recursos para la ejecución de estos (Figura 11).

5.3.5. Conservación de germoplasma

Conservación *in situ*. Es necesario conservar las poblaciones de haba en la región donde son cultivadas. Se plantea iniciar gestiones para implementar programas de conservación *in situ* para la conservación de los materiales genéticos de los productores, con el objeto de proteger sus recursos e iniciar un programa de registro e inventarios y estudios sobre la diversidad interespecífica e intraespecífica como lo señalan Di Castri y Younes (1990) (Figura 11).

Conservación *ex situ*. Una iniciativa regional debe ser el establecimiento de un banco de germoplasma que incluya los materiales de los productores, utilizando metodologías y directrices para la recolección de muestras representativas de diversidad genética de numerosos cultivos, como lo señala Sinha (1981). Se recomienda un banco de germoplasma regional (Figura 11).

5.36. Evaluación permanente y retroalimentación

Realizar evaluaciones de resultados y de manejo para ajustar la oferta a circunstancias particulares. Entrega de alternativas tecnológicas para cada segmento particular de usuarios.

Evaluaciones de la tecnología. Realizar actividades que involucren a los productores de haba en un proceso consultivo para identificar y determinar las necesidades de los mismos en respuesta a sus prioridades. Poner parcelas demostrativas en sus terrenos, módulos demostrativos, etc.

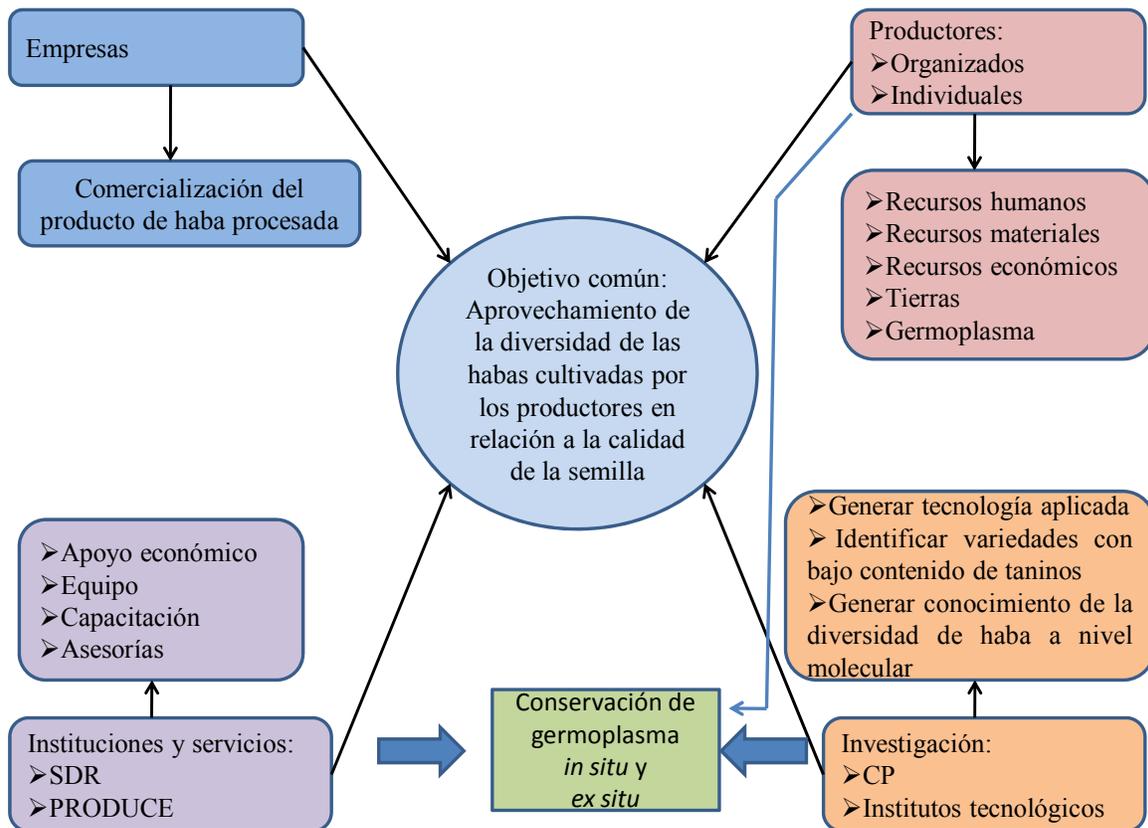
Sistemas de información. Sistemas para la recolección y difusión de la información sobre la transferencia de tecnología y cooperación técnica y científica de manera que se facilite la transferencia de tecnología para la conservación y el uso sostenible de la biodiversidad, y que se promueva y propicie la cooperación técnica y científica, capacitación de técnicos y productores.

Creación de ambientes propicios. Actividades de los productores para formar un entorno favorable para la transferencia de tecnología del sector privado y público y para la adaptación de la tecnología transferida, creación de organizaciones para recibir los paquetes tecnológicos y apoyos de las instituciones.

Creación y mejoramiento de capacidad. La creación o el mejoramiento de la capacidad técnica, científica, institucional y administrativa es una cuestión intersectorial de gran importancia para

realizar evaluaciones de la tecnología, para la creación y el fortalecimiento de los sistemas nacionales o regionales de información tecnológica y para la creación de ámbitos propicios para la transferencia de tecnología y la cooperación tecnológica.

Figura 11. Propuesta de líneas estratégicas para el aprovechamiento de la tecnología generada sobre las diferentes variedades de haba por los productores.



5.3.7. Recursos humanos

Estarían involucrados los grupos de productores del estado de Puebla los cuales aportarían la mano de obra, los investigadores generando conocimientos y tecnologías y los técnicos capacitando a los productores (Figura 11).

5.3.8. Recursos Materiales

Se requiere de la tierra de los productores para montar las parcelas demostrativas, material y equipo proporcionado por la SDR y la Fundación Produce.

5.3.9. Resultados a mediano plazo

Disponer de variedades adaptadas a las condiciones climáticas de la región.

Disponer de variedades resistentes a plagas y enfermedades como el pulgón negro de las habas (*Aphis fabae* Scop), la mancha de chocolate (*Botrytis fabae*) y la Roya (*Uromyces fabae*), que son los principales agentes biológicos que causan daños al cultivo (Díaz-Ruiz, 2010).

Agregar valor nutricional a las variedades de haba mediante la aplicación de técnicas de mejoramiento clásico y la selección asistida por marcadores moleculares a través de la generación de nuevos genotipos, con la finalidad de proveer a los productores, consumidores y la industria de un producto con mayor calidad proteica y menor cantidad de compuestos anti-nutritivos como los taninos.

5.3.10. Resultados del estudio

Identificación de poblaciones de haba con bajo contenido de taninos, las cuales, deben contener cantidad significativa de proteínas disponibles para el consumidor, este carácter lo demandan las empresas para generar alimentos con un valor agregado, de esta forma, se incrementa el valor de las variedades que cubrirán la demanda de los consumidores.

5.3.11. Impacto

Se espera un incremento en cuanto a la producción de este cultivo al identificar un valor agregado para cubrir una demanda de los consumidores.

Las empresas pueden brindar un producto de mayor calidad a los consumidores.

Los ingresos tanto para los productores como para las empresas se verán incrementados.

Al aumentar la producción y la superficie sembrada se generarán nuevos empleos.

Y al hacer uso de sus propias variedades los materiales locales van a ser conservados.

CAPITULO VI. CONCLUSIONES

Existen diferencias significativas en cuanto al contenido de taninos de las variedades de haba, el cual presentó un rango de 2.6% a 11.2%, y las variedades con menor y mayor contenido de dicho compuesto anti nutritivo fueron las señaladas como V-44 y V-72 respectivamente. Así mismo encontramos que no existe correlación significativa entre el contenido de taninos y caracteres de interés agronómico, lo cual nos indica que el contenido de taninos es independiente a la expresión de los caracteres agronómicos.

Utilizando marcadores RAPDs se encontró variabilidad a nivel molecular entre poblaciones de haba cultivadas por agricultores, en las que se definieron en total 9 grupos con diferente número de variedades cada uno donde destacan las 4 que se clasificaron en diferentes grupos, tales variedades fueron la V1, V8, V33 y la V70.

CAPITULO VII. LITERATURA CITADA

- Angulo H. P. y Quiroz C. R. 1999. Base de datos de plantas medicinales y tóxicas del Perú (DAPLAMEP). III Expofarmacia Internacional. Lima 3-6 de Octubre.
- Anthony F., Bertrand B., Quiros O., Wilches A., Lashermes P., Berthaud J., Charrier A. 2001. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica* 118: 53-65.
- Barbosa N. J. F. and Bered F. 1998. Marcadores moleculares e diversidad genética no melhoramento de plantas. *In: Marcadores moleculares en plantas*. Milack S. (ed.). Porto alegre UFRGS. pp 29-41.
- Becerra V. V. y Paredes C. M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agric. Téc. (Chile)*. 60(3):270-281.
- Beckerman M. y Cataife G. 2001. Encadenamientos productivos: estilización e impactos sobre el desarrollo de los países periféricos, Facultad de Ciencias Económicas, Universidad de Buenos Aires, (disponible en: [www.aaep.org.ar/espa/anales/resumen_01/bekerman_cataife.htm] -acceso: Jun 20, 2005).
- Bernier C. C., Hanounik S. B., Hussein M. M. y Mohamed H. A. 1984. Field manual of common faba bean diseases in the Nile Valley. Information Bulletin 3. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA).
- Bond D. A., Lawes D. A., Hawtin G. C., Saxena M. C. y Stephens J. S. 1985. Faba Bean (*Vicia faba* L.). *In: Grain Legume Crops*. Summerfield R. J. y Roberts E. H. (eds.). William Collins Sons Co. Ltd. 8 Grafton Street, London, W1X 3LA, UK. pp 199-265.
- Bonilla M. L., Espinosa K., Posso A. M., Vásquez H. D., Muñoz J. E. 2008. Caracterización molecular de 43 accesiones de uchuva de seis departamentos de Colombia. *Acta Agronómica*. 57 (2): 109-115.
- Brondani R., Brondani C., Tarchini R. y Grattapaglia D. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theor. Appl. Genet.* 97:816-827.
- Burns E. R. 1971. Method for estimation of tannin in grain sorghum. *Agronomy Journal*. 63:511-512.
- Cabrera A. y Martín A. 1986. Variation in tannin content in *Vicia faba* L. *J. Agric. Sci.* 106:377-382.

- Chavan J. K., Kute L. S., Kadam S. S. 1989. Broad bean. In: Salunkhe DK, Kadam SS, editors. CRC hand book of world legumes. Volume I. Boca Raton, U.S.A.: CRC Press. p 223-245.
- COFUPRO. 2010. www.cofupro.org.mx
- Condit R. and Hubbell S. P. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genome. *Genome*. 34:66-71.
- Cubero J. I. 1974. On the evolution of *Vicia faba* L. *Theor. Appl. Genet.* 45:47-51.
- Delouche J. C. 1980. Preceptos para el almacenamiento de semillas. Mimeografiado. CIAT, Colombia.
- Deshpande S. S., Cheryan M., Salunkhe D. K. 1986. Tannin analysis of food products. *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 24: 401-449.
- Díaz-Ruiz R. 2009. Diversidad morfológica de las habas (*Vicia faba* L.) cultivadas en regiones productoras de México y rendimiento de grano. In: Tecnologías de granos y semillas. Libros Técnicos: Serie Agricultura. Martínez R. R, Rojo M. G. E., García G. C., Ramírez V. B. (Coordinadores). Universidad Autónoma Indígena de México, CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa, Colegio de Postgraduados-Campus Puebla. México. pp 263-278.
- Díaz-Ruiz R. 2010. Mancha de chocolate y roya principales enfermedades que dañan las habas en el estado de Puebla. In: Cultivos Sanos (Manejo de plagas y enfermedades con bajo impacto ambiental). Huerta de la Peña A. y Díaz-Ruiz R. (Coordinadores). Colegio de Postgraduados-Campus Puebla, Altres Costa-Amic. México. Pp 182-202.
- Díaz-Ruiz 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, Spain. pp 188-190.
- Díaz-Ruiz R. y Morales-Jiménez J. 2010. Caracteres destacables de las variedades de habas señalados por los productores del valle de Tlachichuca, Puebla. In: Libro de Resúmenes del Foro Regional de Agricultura Sostenible. Sociedad Mexicana de Agricultura Sostenible, Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. México. pp 57-60.
- Díaz-Ruiz R., Satovic Z., Avila C. M., Alfaro C. M., Gutierrez M. V., Torres A. M., Román B. 2009. Confirmation of QTLs controlling *Ascochyta fabae* resistance in different generations of faba bean (*Vicia faba* L.). *Crop & Pasture Science*. 60: 353-361.
- Díaz-Ruiz R., Herrera C. B. E., Sandoval C. E. 2000. La diversidad de haba (*Vicia faba* L.) en el valle de Serdan. XVIII Congreso Nacional de Fitogenética. Sociedad Mexicana de Citogenética. Chapíngo, México. P 115.

- Di Castri y Younes T. 1990. Fonction de la biodiversité au sein de l'écosystème. Compte rendu résumé d'une réunion de travail de l'U.I.S.B-SCOPE, 29-30 junio 1989, Washington.
- Dice L. R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*. 26:297-302.
- Duc G. 1997. Faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Research*. 53: 99-109.
- Duke J. A. 1981. Handbook of legumes of world economic importance. Plenum Press, New York. pp 199-265.
- Ellis R. H., Hong T. D. y Roberts E. H. 1985. Handbook of Seed Technology for Genebanks. Vol. I. Principles and Methology. Roma, CIRF.
- Feo V. 1991. Medicinal and Plants in The Northem of Peruviam Andes. *Fitoterapia*. 62: 246-247.
- FAO, (2003). FAO Yearbook Production 2002, vol. 55. Food and Agriculture Organization of the United States. FAO Statistics Series No. 176. Roma.
- Guadarrama Q. A.; Escalante E. J. A.; Rodríguez G. M. T.; Sánchez G. P.; Sandoval C. E. 2007. Biomasa, proteína, taninos y rendimiento en haba en función del nitrógeno. *TERRA Latinoamericana*. 25 (2):169-175.
- Guerrero A. 1983. El cultivo de las leguminosas de grano. *In: Leguminosas de grano*. Cubero J. I. and Moreno M. T. (eds). Madrid, Spain. pp. 121-174.
- Gutierrez N., Avila C. M., Moreno M. T., Torres A. M. 2008. Development of SCAR markers linked to *zt-2*, one of the genes controlling absence of tannins in faba bean. *Australian Journal of Agricultural Research*. 59: 62-68.
- Harinder P., Makkar S., Becker K., Abel H., and Pawelzik E. 1997. Nutrient contents, rumen protein degradability and antinutritional factors in some colour-and white-flowering cultivars of *Vicia faba* beans. *J. Sci. Food Agric*. 75: 511-520.
- Heidelberg M. W. 1994. Importance of the polymerase chain reaction (PCR) for plant science. *Bioforum Extra*, Prague. pp 5-11.
- Hebblethwaite P. D. 1983. The faba bean (*Vicia faba* L.). A basis for improvement. Butterworths, London, England. 573 p.
- Hulse J. H. 1994. Nature, composition and utilization of food legumes. *In: Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes*. Muehlbauer F. J. y Kaiser W. J. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp 77-97.

- Hussein L. A. and Saleh M. 1995. Antinutritional factors in faba beans. *In: Proceedings of the International Workshop on Faba Beans, Kabuli Chickpeas and Lentils in the 1980s.* M. C. Saxena and S. Verma (eds.). ICARDA. Aleppo, Syria. pp 257-269.
- Irwin S. V., Kafusi P., Banks K., de la Peña R., Cho J. J. 1998. Molecular characterization of taro (*Colocasia esculenta*) using RAPD markers. *Euphytica.* 99:183-189.
- Jansman J. M., Huisman J. and van der Poel A. F. B. 1993. Ileal and fecal digestibility in piglets of field beans (*Vicia faba* L.) varying in tannin content. *Anim. Feed Sci. Technol.* 42:83-96.
- Katzir N., Danin-Poleg Y., Tzuri G., Karchi Z., Lavi U. and Cregan P. 1996. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. *Theor. Appl. Genet.* 93:1282-1290.
- Lawes D.A. 1980. Recent developments in understanding, improvement and use of *Vicia faba*. *In: Advances in Legumes Science.* Summerfield R. J. y Bunting A. H. (eds.). Proceedings of the International Legume Conference, Kew. 31 July-4 August 1978, Royal Botanic Garden, Kew, the Missouri Botanical Garden, and the University of Reading, UK. pp 625-636.
- Lee M. 1995. DNA markers and plant breeding programs. *Adv. Agron.* 55:265-344.
- Macas J., Dolezel J., Lucretti S., Pich U., Meister A., FuChs J. and Schubert I. 1993. Localization of seed protein genes on flow sorted field bean chromosomes. *Chromosomes Res.* 1:107-115.
- Maroto J. V. 1989. Habas. *In: Horticultura Herbácea Especial.* Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Maxon E. D. y Rooney L. W. 1972. Two methods of analysis for *Sorghum bicolor* (L.) Moench grain. *Crop Science.* 12:253-254.
- Monfort A., García-Mas J., Puigdomènech P. and Arús P. 2002. Estructura del genoma. *In: Genómica y mejora vegetal.* Nuez F., Carrillo J. M. and Lozano R. (eds). Mundi-Prensa, Consejería de Agricultura y Pesca. pp 67-103.
- Morillo C. A., Muñoz J. E., Vásquez H. D., Zamorano A. 2005. Caracterización molecular con microsatélites aleatorios RAMs de la colección de mora, *Rubus* spp, de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. *Acta Agronómica.* 54(2):15-24.
- Müller U. G. and Wolfenbarger L. L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol. Evol.* 14:389-394.
- Nadal M. S., Moreno Y. M. y Cubero S. J. I. 2004. Las leguminosas grano en la agricultura moderna. Ediciones Mundi-Prensa. España. 318 p.

- Paterson A. H, Tanksley S. D. and Sorrells M. E. 1991. DNA markers in plant improvement. *Advances in Agronomy*. 46:39-90.
- Perl-Treves R., Zamir R., Navot D. and Galun E. 1985. Phylogeny of *Cucumis* based on isozyme variability and its comparison with plastome phylogeny. *Theor. Appl. Genet.* 71:430-436.
- Picard J. 1976. Aperçu sur l'hérédité du caractère absence de tanins dans les graines de féverole (*Vicia faba* L.). *Ann. Amélior. Plantes.* 26:101-106.
- Powell W., Mrgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S. and Rafalsky A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP, and SSR (Microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2:225-238.
- Price M. L., Van S. S. and Butler L. G. 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* 26:1214-1218.
- Puldón P. V. 2006. Documentación, conservación y multiplicación de germoplasma. Instituto de Investigaciones del Arroz (IIArroz). I Curso de capacitación genético en arroz, Saneti Espiritu, Cuba, 30 de Octubre al 10 de noviembre 2006.
- Ramsay G. 1997. Inheritance and linkage of a gene for testa-imposed seed dormancy in faba bean (*Vicia faba* L.). *Plant Breeding.* 116:287-289.
- Rubiales D. 1996. Royas. *In: Patología Vegetal*. Yacer G., López M. M., Trapero A. y Bello A. (eds). Vol.II. Sociedad Española de Fitopatología, Editorial Phytoma.
- SAGARPA. 2008. Anuario Estadístico Agrícola 2008. Oficina estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable (OEIDRUS). (En línea). Disponible en <http://www.oeidrus-puebla.gob.mx/>
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Segunda edición. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1659 p.
- Sinha G. C. 1981. Gene pool sampling in tree crops. *In: Plant Exploration and Collection*. Mehra K. L., Arora R. K., Wadhim S. R. (eds.). NBPGR Sci. Monograph No 3, Nueva Delhi.
- Smart J. 1990. *Grain Legumes: Evolution and genetic resources*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 200 p.
- Toledo V. M., Alarcón-Chaires P., Miguel P., Olivo M., Cabrera A., Leyequien E. y Rodríguez-Aldabe A. 2001. El Atlas etnoecológico de México y Centroamérica: Fundamentos, métodos y resultados. *Etnoecológica.* 4:71-41.

- Torres A. M., Weeden N. F., Martín A. 1993. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. Theor. Appl. Genet. 85:937-945.
- Valdizan H. y Maldonado A. 1922. La medicina popular peruana. Tomo II. Lima-Peru.
- White T. J., Arnheim N. and Erlich H. A. 1989. The polimerase chain reaction. Technical Focus, Elsevier Science Publishers, Ltd, UK. 5 (6):185-189.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. 1990. DNA polimorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.
- Wright M. 1979. Guía práctica ilustrada para El Jardin. Tomo 2. Editorial Blume. Barcelona. pp 350- 351
- Xu Y. 2003. Developing marker-assisted selection strategies for breeding hybrid rice. Plant Breeding Review. 23:73-174.
- Zohary D. and Hopf M. 1973. Domestication of pulses in the Old World. Science. 182:887-894.

ANEXOS

Anexo 1. Contenido de taninos en 60 variedades de haba.

| Variedad | Taninos (%) | Variedad | Taninos (%) |
|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|
| V-44 | 2.6 f | V-51 | 6.2 tsu |
| V-75 | 2.7 f | V-281 | 6.3 tsr |
| V-181 | 3.4 e | V-36 | 6.5 qsr |
| V-52 | 3.9 de | V-31 | 6.9 qpr |
| V-53 | 4.1 d | V-8 | 7.0 qpro |
| V-57 | 4.4 dc | V-20 | 7.0 qnpro |
| V-22 | 4.4 dc | V-47 | 7.0 qnpo |
| V-49 | 4.8 bc | V-50 | 7.2 mnpo |
| V-146 | 4.8 bca | V-41 | 7.3 mnplo |
| V-95 | 4.9 bca | V-11 | 7.3 mnplo |
| V-93 | 5.0 bcaz | V-55 | 7.4 mknplo |
| V-24 | 5.0 ybcaz | V-61 | 7.6 mknjlo |
| V-15 | 5.1 ybxaz | V-65 | 7.6 mknjl |
| V-56 | 5.4 wybxaz | V-74 | 7.7 mkijl |
| V-60 | 5.4 wybxaz | V-10 | 7.9 kijl |
| V-13 | 5.4 wybxaz | V-33 | 8.1 kijh |
| V-43 | 5.4 wyvxaz | V-54 | 8.1 gijh |
| V-69 | 5.5 wyvxaz | V-66 | 8.3 gifh |
| V-18 | 5.6 wyvxuz | V-199 | 8.3 gifh |
| V-70 | 5.7 wyvxu | V-62 | 8.7 gefh |
| V-59 | 5.7 wyvxu | V-6 | 8.8 gef |
| V-58 | 5.7 wtvxu | V-35 | 8.9 efd |
| V-96 | 5.7 wtvxu | V-3 | 9.2 ced |
| V-73 | 5.7 wtvxu | V-34 | 9.3 cebd |
| V-288 | 5.8 wtvu | V-9 | 9.4 cbd |
| V-19 | 6.0 wtvxu | V-68 | 9.6 cb |
| V-94 | 6.1 tvsu | V-1 | 9.9 b |
| V-42 | 6.1 tsu | V-5 | 10.6 a |
| V-71 | 6.2 tsu | V-12 | 10.6 a |
| V-46 | 6.2 tsu | V-72 | 11.2 a |

Anexo 2. Marcadores RAPDs polimórficos utilizados en 60 variedades de haba.

| Peso Mol. | OPA-14 | | | OPH-12 | | | |
|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 886 pb | 723 pb | 556 pb | 1566 pb | 984 pb | 730 pb | 579 pb |
| No. Serie | Banda 1 | Banda 2 | Banda 3 | Banda 1 | Banda 2 | Banda 3 | Banda 4 |
| 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 3 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 5 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 6 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 7 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 8 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 9 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 10 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 11 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 12 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 13 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 14 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 15 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 16 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 17 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 18 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 19 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 20 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 22 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 23 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 24 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 25 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 26 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 27 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 28 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 29 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 30 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 31 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 32 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 33 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 34 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 35 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 36 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |

| | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|---|---|
| 37 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 38 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 39 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 40 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 41 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 42 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 43 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 44 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 45 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 46 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 47 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 48 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 49 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 50 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 51 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 52 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 53 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 54 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 55 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 56 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 57 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 58 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 59 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 60 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |

Continuación del Anexo 2. Marcadores RAPDs polimórficos utilizados en 60 variedades de haba.

| Peso Mol | OPM-05 | | | | | OPN-13 | |
|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 669 pb | 589 pb | 405 pb | 312 pb | 141 pb | 597 pb | 383 pb |
| No. Serie | Banda 1 | Banda 2 | Banda 3 | Banda 4 | Banda 5 | Banda 1 | Banda 2 |
| 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 6 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 7 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 11 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 12 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 13 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 14 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 15 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 16 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 17 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 18 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 19 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 20 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 21 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 22 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 23 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 24 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 25 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 26 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 27 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 28 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 29 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 30 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 31 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 32 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 33 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 34 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 35 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 36 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

| | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|---|---|
| 37 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 38 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 39 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 40 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 41 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 42 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 43 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 44 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 45 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 46 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 47 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 48 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 49 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 50 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 51 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 52 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 53 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 54 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 55 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 56 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 57 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 58 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 59 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 60 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Continuación del Anexo 2. Marcadores RAPDs polimórficos utilizados en 60 variedades de haba.

| Peso Mol. | OPF-13 | | | | | OPAC-20 | | | | |
|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 1243 pb | 970 pb | 835 pb | 552 pb | 149 pb | 1085 pb | 887 pb | 753 pb | 584 pb | 408 pb |
| No. Serie | Banda 1 | Banda 2 | Banda 3 | Banda 4 | Banda 5 | Banda 1 | Banda 2 | Banda 3 | Banda 4 | Banda 5 |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 5 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 6 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 7 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 11 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 12 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 13 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 14 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 15 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 16 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 17 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 18 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 19 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 20 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 21 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 22 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 23 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 24 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 25 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 26 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 27 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 28 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 29 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 30 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 31 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 32 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 33 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 34 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 35 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 36 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |

| | | | | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 37 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 38 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 39 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 40 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 41 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 42 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 43 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 44 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 45 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 46 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 47 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 48 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 49 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 50 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 51 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 52 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 53 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 54 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 55 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 56 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 57 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 58 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 59 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 60 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |