

Caracterización de germoplasma nativo de frijol con base en marcadores moleculares y atributos de calidad*

Characterization of native bean germplasm based upon molecular markers and quality attributes

Carmen Jacinto-Hernández^{1§}, Ramón Garza-García², Dagoberto Garza-García¹ e Irma Bernal-Lugo³

¹Campo Experimental Valle de México-INIFAP, km 13.5 Carretera Los Reyes-Texcoco. San Miguel Coatlinchán, Texcoco, Estado de México. C. P. 56250. México. Tel. 01 (595) 9212715. Ext. 140. (dagarza60@yahoo.com). ²Universidad de Tamaulipas (rgarzagarcia@gmail.com). ³Facultad de Química-UNAM. (irmofel@unam.mx). [§]Autora para correspondencia: jacinto.carmen@inifap.gob.mx.

Resumen

La caracterización del germoplasma nativo es fundamental para el conocimiento de la diversidad genética y su aprovechamiento en el fitomejoramiento de la calidad del grano para satisfacer la demanda de los consumidores y mejorar su nutrición sin modificar sus hábitos alimenticios. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue estimar la variabilidad genética de 111 genotipos nativos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de diferentes estados de México con marcadores RAPD y por sus atributos de calidad física, culinaria y contenido de proteína. Se determinó la similitud genética entre variedades por el método de promedios aritméticos de grupos apareados no ponderados (UPGMA). Con los datos sobre calidad, se realizó un análisis de componentes principales y de agrupamiento jerárquico. Cuando se utilizaron todas las variedades para generar los dendrogramas, los grupos no fueron claros, aunque parecieron estar determinados por localización geográfica; cuando se analizaron por separado los genotipos de colores amarillo mostaza y negro, en ambos casos se generaron grupos bien definidos y similares entre los obtenidos con las características tecnológicas y con los RAPD. Los genotipos nativos sobresalientes por combinar las características de calidad culinaria y alto contenido de proteína (>24.8%) fueron *Ph.vulg.* 2346

Abstract

Native germplasm characterization is fundamental to the understanding of genetic diversity and its use in the breeding of grain quality to meet consumer demand and improve their nutrition without changing your eating habits. Therefore, the aim of this study was to estimate the genetic variability of 111 native bean genotypes (*Phaseolus vulgaris* L.) from different states of Mexico with RAPD markers and physical quality attributes, culinary and protein content. Genetic similarity was found between varieties by the method of arithmetic unweighted paired group (UPGMA). With the data on quality, we performed a principal component analysis and hierarchical clustering. When all varieties were used to generate the dendrograms, the groups were not clear, but appeared to be determined by geographic location, when analyzed separately genotypes of yellow mustard and black, both groups were generated either defined or similar to those obtained with the technological characteristics and RAPDs. Native genotypes by combining outstanding cooking quality characteristics and high in protein (>24.8%) were *Ph.vulg.* 2346 (beige), *Ph.vulg.* 403 (sulfur), *Ph.vulg.* 2435 (bay) and *Ph.vulg.* 2519 (yellow mustard), which could be useful in breeding programs.

* Recibido: julio de 2013
Aceptado: febrero de 2014

(beige), *Ph.vulg.*403 (azufrado), *Ph.vulg.*2435 (bayo) y *Ph.vulg.*2519 (amarillo mostaza), las cuales podrían ser útiles en los programas de mejoramiento.

Palabras clave: variedades nativas de *Phaseolus vulgaris*, calidad culinaria, contenido de proteína marcadores RAPD, relaciones genéticas.

Introducción

México es centro de origen de frijol (Gepts y Debouck, 1991), por lo que existe una gran diversidad genética expresada en la gran variabilidad en atributos de calidad del germoplasma nativo de frijol (Jacinto-Hernández *et al.*, 2002b; Muñoz *et al.*, 2009). Se cultiva en las diferentes regiones agroecológicas que existen y puede prosperar desde nivel del mar hasta 2 300 msnm. Esta gran variabilidad evidencia una fuente de genes que debe ser aprovechada en el mejoramiento genético, para generar nuevas variedades con las características organolépticas valoradas por los consumidores(as).

La utilización de esta variabilidad genética permitió introducir en la variedad Bayo Azteca la resistencia a picudo del ejote (*Apion godmani* W.), plaga que causa hasta 80% de pérdidas a la producción en los Valles Altos de México. Actualmente en el Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX), se emplean los criollos Negro México-332 y el J-117 como fuente de resistencia a enfermedades como tizón común y antracnosis.

Sin embargo, esta riqueza genética se ve amenazada por diferentes factores, como el cambio en el uso de la tierra, el cambio climático que afecta la agricultura; así como por la disminución de la población económicamente activa dedicada a la agricultura. De lo anterior se deduce que la caracterización del germoplasma nativo es de capital importancia para los programas de fitomejoramiento. Por lo que el objetivo del presente estudio fue 1) estimar la variabilidad genética de 111 variedades de frijol nativo de diferentes estados de México con base en el polimorfismo detectado con marcadores tipo RAPD y por sus atributos de calidad física, culinaria y contenido de proteína; y 2) seleccionar los genotipos sobresalientes para el mejoramiento genético enfocado a generar variedades mejoradas con atributos morfológicos y de calidad culinaria similares a las preferidas por los consumidores(as) en las áreas rurales, pero con mayor aporte nutrimental, por su contenido de proteína.

Key words: *Phaseolus vulgaris* landraces, cooking quality, protein content, RAPD markers, genetic relationships.

Introduction

Mexico is the center of origin of beans (Gepts and Debouck, 1991), so that there is great genetic diversity expressed in the great variability in quality attributes bean native germplasm (Jacinto-Hernández *et al.*, 2002b; Muñoz *et al.*, 2009). Growing in the different agro-ecological regions that can exist and thrive from sea level to 2 300 meters. This variability demonstrates a source of genes that should be exploited in breeding to generate new varieties with the organoleptic characteristics valued by consumers.

The use of this genetic variability in the range allowed to introduce for Bayo Azteca a resistance of the bean weevil (*Apion godmani* W.), a pest that causes up to 80% losses to production in the high valleys of Mexico. Currently in the Valley of Mexico Experimental Field (CEVAMEX) we use landraces Negro Mexico-332 and J-117 as a source of disease resistance to common blight and anthracnose.

However, this genetic wealth is threatened by various factors, such as changes in land use, climate change affects agriculture, as well as by decreasing the economically active population engaged in agriculture. Based on this, native germplasm characterization is of paramount importance for breeding programs. So the aim of this study was 1) to estimate the genetic variability of 111 native bean varieties from different states of Mexico based on the polymorphism detected with RAPD markers and physical quality attributes, culinary and protein content; and 2) select the outstanding genotypes for genetic improvement focused on generating improved varieties and morphological attributes like culinary quality preferred by consumers in rural areas, but more nutritional intake for their protein content.

Materials and methods

Plant material

From the Germplasm Bank of the National Research Institute for Forestry, Agriculture and Livestock (INIFAP) in Mexico, we selected 111 collections adapted to altitudes

Materiales y métodos

Material vegetal

Del Banco de Germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en México, se seleccionaron 111 colectas adaptadas a altitudes superiores a 1 000 msnm, colectadas de 1940 a 1984, de acuerdo a sus datos de pasaporte, las cuales fueron provenientes de 17 estados de México. Ésta colección representa un referente de esa época, de los tipos de frijol predominantes del Estado de México y Puebla, de donde proceden el mayor número de ellas (64% del total). Se incluyó además la variedad mejorada Flor de Mayo M-38, como testigo.

Las semillas, cien de cada colecta, se sembraron en parcelas para su multiplicación, en Santa Lucía de Pías, Texcoco, Estado de México, que se ubica a los 19° 27' latitud norte y 98° 53' longitud oeste; a 2 250 msnm. El clima en el área se clasifica como Cb (Wo), templado con lluvias en verano y una temperatura media anual de 15.2 °C, con una precipitación de 636.5 mm anuales (García 1988). Cada colecta se sembró en un surco de 4 m de longitud, separados por un surco, para evitar contaminación. Las plantas se regaron y fertilizaron con la dosis N-P-K fue de 40-40-00 al momento de la siembra. Se colocaron estacas de madera para que pudiesen desarrollar sus guías las variedades de hábito IV.

Se registró el hábito de crecimiento de las variedades de acuerdo a la clasificación del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT 1984). Del total de colectas, 109 mostraron un sólo color de grano y dos estuvieron compuestas por distintos colores, en estos casos de cada accesión se seleccionaron granos del color predominante. Para el manejo de las colectas en el campo y en el laboratorio se les asignó un número de identificación denominado "tratamiento", y entre paréntesis se indica el número de curador asignado por el Banco de Germoplasma.

Análisis RAPD

El ADN se extrajo mediante el método descrito por Afanador *et al.* (1993), de la hoja trifolia de plantas cultivadas en el invernadero en 2009. Se almacenó a -20 °C. Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron en un equipo Techne-PHC-512, con las condiciones descritas por Jacinto-Hernández *et al.* (2003).

above 1 000 m, collected from 1940-1984, according to passport data, which were from 17 States. This collection represents a benchmark of the time, the predominant bean types of the State of Mexico and Puebla, from where the largest number of them (64% of total). It also included the improved variety Flor de Mayo M-38, as a control.

The seeds, hundreds of each collection were planted in plots for multiplication, in Santa Lucía Pías, Texcoco, State of Mexico, which is located at 19° 27' north latitude and 98° 53' west longitude, to 2 250 meters. The climate in the area is classified as Cb (Wo), tempered with rains in summer and an average annual temperature of 15.2 °C, with an annual precipitation of 636.5 mm (García, 1988). Each collection was sowed in a furrow of 4 m in length, separated by a groove, to prevent contamination. The plants were watered and fertilized with dose was 40-40-00 NPK at planting time. Wooden stakes were placed so they could develop their habit guides IV varieties.

Joined growth habit varieties according to the classification of the International Center for Tropical Agriculture (CIAT 1984). Of all the collections, 109 showed a single grain color and two were composed of different colors, in these cases of each accession were selected prevailing color beads. For the management of the collections in the field and in the laboratory was assigned an identification number called "treatment", and in brackets indicates the number of curator assigned by the Germplasm Bank.

RAPD analysis

DNA was extracted by the method described by Afanador *et al.* (1993) trifolia leaf of greenhouse-grown plants in 2009. Stored at -20 °C. Chain reactions (PCR) were performed on a Techne-PHC-512, with the conditions described by Jacinto-Hernández *et al.* (2003).

Molecular data were arranged in a matrix of RAPD fragments were graded 1 or 0 for the presence or absence of the band respectively using the NTSYS package (Rohlf, 2002). Only included in the data analysis of the bands that could unequivocally be described in all the samples. The genetic similarities between samples were grouped by the arithmetic method of unweighted paired-group-UPGMA (Sneath and Sokal, 1981), with this information we generated a dendrogram with the NTSYS-pc.

Los datos moleculares se ordenaron en una matriz en la que los fragmentos de RAPD se calificaron 1 ó 0 para presencia o ausencia de la banda respectivamente utilizando el paquete NTSys (Rohlf 2002). Únicamente se incluyeron en el análisis los datos de las bandas que pudieron inequívocamente ser calificadas en todas las muestras. Las similitudes genéticas entre muestras se agruparon por el método de promedios aritméticos de grupos apareados no ponderados-UPGMA- (Sneath y Sokal 1981), con ésta información se generó un dendrograma con el NTSYS-pc.

Pruebas físicas, calidad culinaria y contenido de proteína

Los genotipos se clasificaron por su raza, según la descripción de Singh *et al.* (1991), así como también por su tamaño, color y brillo de la testa, de acuerdo al CIAT (1987). Las características tecnológicas, asociadas con la calidad culinaria que se midieron fueron la capacidad de absorción de agua, tiempo de cocción del grano y el porcentaje de sólidos en el caldo, que es un indicador del espesor del mismo, así como el porcentaje que representa la testa con respecto al peso total del grano. Las pruebas se realizaron por duplicado, de acuerdo a la metodología descrita por Guzmán *et al.* (1995).

Se analizó el contenido de nitrógeno por el método Kjeldahl, utilizando el equipo semiautomatizado Kjelttec-1030. El porcentaje de proteína se obtuvo a partir del nitrógeno total, aplicando el factor 6.25. Los datos de calidad de grano se analizaron bajo un diseño completamente al azar, con 14 tipos de frijol (con base a color) y 112 tratamientos (111 genotipos nativos y una variedad mejorada), ambos con dos repeticiones. Se usó el procedimiento Modelo Lineal General (GLM) del programa Sistema de Análisis Estadístico (SAS) versión 8 (SAS, 1999). La comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Además, se obtuvo una matriz de correlaciones de Pearson. Se aplicó un análisis de componentes principales y se obtuvo el coeficiente de determinación (R^2) de cada variable con respecto a su componente principal correspondiente y un agrupamiento jerárquico a los 112 tratamientos, con el procedimiento Cluster opción estándar y el método de ligamiento promedio de SAS (SAS Institute 1999).

Physical tests, cooking quality and protein content

The genotypes were classified by race, as described by Singh *et al.* (1991), as well as its size, color and brightness of the head, according to CIAT (1987). Technological features associated with cooking quality measured were the water absorption capacity, grain-cooking time and the percent solids in the broth, which is an indicator of thickness thereof, and the rate of the head with respect to the total weight of the grain. The tests were performed in duplicate according to the methodology described by Guzmán *et al.* (1995).

We analyzed the nitrogen content using the method described by the Kjeldahl, using semi-automated equipment Kjelttec-1030. Protein percentage was obtained from the total nitrogen, the factor 6.25. The grain quality data were analyzed under a completely randomized design, with 14 kinds of beans (based on color) and 112 treatments (genotypes 111 native and improved variety), each with two replicates. We used the General Linear Model procedure (GLM) of the Statistical Analysis System program (SAS) version 8 (SAS, 1999). The comparison of means was made with the Tukey test ($p < .05$). In addition, we obtained a Pearson correlation matrix. We applied a principal component analysis and obtained the coefficient of determination (R^2) of each variable with respect to its main component and a hierarchical clustering corresponding to the 112 treatments, with the procedure Cluster standard option and the average linkage method (SAS Institute 1999).

Results and discussion

Growth habit characterization and grain color

Of the 111 varieties, four (3.6% of the total) were classified as erect growth habit (habit II), 92 (82.9%) and semi-prostrate guide (habit III) and six (5.11%) and climbing (habit IV), in nine genotypes data was obtained. On the coat color formed 14 groups, which were called "types" of beans. Predominant genotypes of yellow mustard (19.8%) and black (22.5%), although in diversity were

Resultados y discusión

Caracterización por hábito de crecimiento y color de grano

De las 111 variedades, cuatro (3.6% del total) se clasificaron como de hábito de crecimiento erecto (hábito II); 92 (82.9%) como semiguía postrado (hábito III) y seis (5.11%) como trepador (hábito IV), en nueve genotipos no se obtuvo el dato. Por el color de la testa se formaron 14 grupos que se denominaron “tipos” de frijol. Predominaron los genotipos de color amarillo mostaza (19.8%) y negro (22.5%); aunque dentro de la diversidad se apreciaron algunos poco convencionales como color vino, acerados, vino con pintas crema y pinto moteado morado-crema-negro. Un 58% de los genotipos mostró testa brillante y 42% testa opaca, lo cual coincide con lo descrito por Cárdenas *et al.* (1996) quienes indican que del total de las colectas existentes en el Banco de Germoplasma del INIFAP; 70% tienen testa brillante o intermedio y 30% testa opaca. Dentro del grupo de los negros hubo 21 brillantes y sólo 4 opacos.

Considerando lo detectado en trabajos de recolección de frijol nativo recientes (Díaz *et al.*, 2008; Ramírez-Pérez *et al.*, 2012), el patrón de preferencia en la zona de Puebla, de donde proviene la mayor parte de genotipos del presente estudio (47.7%), continúa siendo similar al de hace más de 30 años (Cárdenas *et al.*, 1996), con predominancia de los tipos color amarillo mostaza, negro y crema, aunque no se ha documentado si ha habido variación en la diversidad genética dentro de cada tipo de frijol, como consecuencia, entre otros factores, del cambio climático.

En la época en la que se colectaron los genotipos nativos estudiados, los efectos del cambio climático eran menores. En la zona de los Valles Altos de México, de donde provienen la mayoría de los genotipos, el cultivo se realiza bajo condiciones de temporal, por lo que la siembra depende del inicio de la época de lluvia. De acuerdo a los datos de la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA, 2008; SIAP, 2008) de México y a los de Breña (2004), la precipitación pluvial en los primeros meses del año ha disminuido.

Hace aproximadamente 10 años la precipitación pluvial en marzo, permitía establecer las siembras; mientras que actualmente es en mayo, junio o julio cuando se inician. El periodo de lluvias y libre de heladas, que antes era de 130 a 140 días, actualmente es de aproximadamente 110 a 120.

seen as some unconventional burgundy steely wine with cream paint and paint-cream mottled purple-black. 58% of the genotypes showed 42% shiny and opaque testa, which is consistent with that described by Cardenas *et al.* (1996) who indicated that, the total existing collections in INIFAP Seed Bank, 70% have bright or intermediate and 30% opaque testa. Within the group there were 21 blacks only 4 bright and opaque.

We detected in native bean collection (Díaz *et al.*, 2008; Ramírez-Pérez *et al.*, 2012), the pattern of preference in the Puebla area, from which most of genotypes of this study (47.7%) remains similar to that of 30 years ago (Cárdenas *et al.*, 1996), with predominance of the types mustard yellow, black and cream, although not documented whether any variation in genetic diversity within each type of bean, as a result, among other factors, from climate change.

In the time that we collected native genotypes studied, the effects of climate change were lower. In the area of the high valleys of Mexico, from which most of the genotypes, the cultivation is done under rainfed conditions, so planting depends on the onset of the rainy season. According to data from the National Water Commission (CONAGUA, 2008; SIAP, 2008) of Mexico and Breña (2004), the rainfall in the first months of the year has decreased.

About 10 years ago the rainfall in March, allowed to establish the plantings, while currently is in May, June or July when they start. The rainy season and frost free, formerly of 130 to 140 days, currently around 110-120. Before the rainy season, it is not possible to establish a crop. This effect of climate change has a direct impact on the diversity of crops and a short rainy season planting genotypes limits the long cycle (20-150 days), characteristic of native bean genotypes that would be affected by the low temperatures, typical of the Highlands, before the end of its development cycle.

Molecular characterization

RAPD analysis of 121 bands were obtained, whose size ranged from 0.3 to 3 kb. The number of bands generated by first ranged from 7 to 16 and 89% were polymorphs. In the dendrogram generated with RAPD data (figure not presented by the display data complexity due to the number of genotypes) were formed three groups, which were formed subgroups tended to be associated with the geographical origin. The genotype 165 (*Ph.vulg.* 393), from the State of

Antes de la temporada de lluvias no es posible establecer el cultivo. Éste efecto del cambio climático tiene un impacto directo sobre la diversidad de los cultivos ya que un periodo de lluvias corto limita la siembra de genotipos de ciclo largo (20-150 días), característico de los genotipos nativos de frijol, que serían afectados por las bajas temperaturas, propias de los Valles Altos, antes de concluir su ciclo de desarrollo.

Caracterización molecular

Del análisis con RAPDs se obtuvieron 121 bandas cuyo tamaño varió de 0.3 a 3 kb. El número de bandas generadas por primer varió de 7 a 16 y 89% fueron polimórficas. En el dendrograma generado con los datos RAPD, (figura no presentada por la complejidad para visualizar los datos debido al número de genotipos) se conformaron tres grupos, en los cuales se formaron subgrupos con tendencia a asociarse con el origen geográfico. El genotipo 165 (*Ph. vulg.* 393), originario del Estado de México se ubicó independiente a los demás grupos del dendrograma. Ésta variedad es de color amarillo mostaza, y es de las pocas de hábito IV.

Tamaño de grano, calidad culinaria y contenido de proteína

Se observó una gran diversidad entre tipos, en el tamaño de grano, medido como volumen, que osciló entre 12 y 48 mL. Ésta variable se relaciona directamente con el peso ($r=0.95^{**}$), el cual mostró un intervalo de 13 hasta 53.6 g / 100 semillas. La mayoría de los genotipos nativos fueron de tamaño mediano (de 25-40 gramos por 100 semillas) y existieron sólo tres de grano grande (> 40 g/100 semillas) en color amarillo mostaza, bayo y crema. La densidad, de los granos, la cual se relaciona con el espacio que la semilla requiere para su almacenamiento y probablemente también con las propiedades organolépticas varió entre 0.88 y 1.65 g/mL.

La capacidad de los genotipos para absorber agua fue de 9 a 108%. Existió una asociación negativa entre nivel de agua absorbida ($r=-0.69^{**}$) con el tiempo de cocción, es decir que las muestras que absorbieron mayor cantidad de agua mostraron tiempos de cocción más breves, lo cual coincide con lo encontrado por Jacinto-Hernández *et al.* (2002a), quienes detectaron una correlación de $r=-0.66^{**}$ entre la capacidad del grano para absorber agua y el tiempo de cocción.

Mexico was independent of other groups of the dendrogram. This variety is yellow mustard, and is among the few of habit IV.

Grain size, cooking quality and protein content

There was a great diversity among types in the grain size, as measured by volume, which ranged from 12 to 48 mL. This variable is directly related to weight ($r=0.95^{**}$), which showed a range of 13 to 53.6 g / 100 seeds. Most native genotypes were medium size (25-40 grams per 100 seeds) and there were only three large grains (> 40 g/100 seeds) in yellow mustard, bay and cream. The density of the grains, which is related to the space required for the seed storage and probably also with the organoleptic properties varied between 0.88 and 1.65 g/mL.

Genotypes capacity to absorb water was 9 to 108%. There was a negative association between absorbed water level ($r=-0.69^{**}$) with cooking time, *i.e.* samples absorbed more water showed shorter cooking times, which is consistent with the findings of Jacinto-Hernández *et al.* (2002a), who detected a correlation of $r=-0.66^{**}$ between the ability of the grain to absorb water and cooking time.

Different varieties were cooked between 55-126 min. This wide range in cooking time may be due to genotype-environment interaction (Jacinto-Hernández *et al.*, 2003).

The varieties Flor de Mayo and beans were the average required more cooking time (99 and 97 min, respectively) compared with black-opaque were milder cooking (Table 1). By contrasting the cooking time of beans with bright opaque black was observed that varieties with bright head showed longer cooking times, which could be related to the effect of cuticular wax layer which gives the brightness of the head, and the thickness and uniformity, the study of Bushey *et al.* (2002), can influence the ability of water absorption during soaking.

However, some genotypes, and treatment 31 (*Ph. vulg.* 1975) (glossy black) and treatment 110 (*Ph. vulg.* 6) (bright-steel-coffee) were quick cooking (75 min), even though showed low capacity to absorb water, which is known as "testa dura", whereas 15 genotypes and treatment (*Ph. vulg.* 4823) (Flor de Mayo) and treatment 11 (*Ph. vulg.* 1941) (small

Las diferentes variedades se cocieron entre 55 a 126 min. Éste amplio intervalo en el tiempo de cocción puede deberse a la interacción genotipo- ambiente (Jacinto-Hernández *et al.*, 2003).

Las variedades del tipo Flor de Mayo y alubia fueron las que en promedio requirieron mayor tiempo de cocción (99 y 97 min respectivamente), en comparación con los negro-opaco que fueron más suaves a la cocción (Cuadro 1). Al contrastar el tiempo de cocción del frijol negro opaco con el brillante se observó que las variedades con testa brillante mostraron tiempos de cocción más largos, lo cual podría relacionarse con el efecto de la capa de cera epicuticular que confiere el brillo de la testa; y cuyo grosor y uniformidad, según el estudio de Bushey *et al.* (2002), pueden influir en la capacidad de absorción de agua durante el remojo.

bean) embedded over 90% water, relative to its weight, and showed cooking times exceeding 100 min. This shows that the hardness characteristics of the cooking and testa permeability can be independent.

Means with different letters in each column are statistically different ($p < .05$).

Significant differences in the thickness of the cooking stock between bean types. The interval solids in the broth were between 0.22% and 0.60%, indicating a variety of options in the culinary use. These results agree with those reported by Jacinto and Campos (1993), for improved varieties. A longer cooking time broths were thicker, suggesting that when the cooking time is prolonged leaching enables greater amount of solid grain, mainly carbohydrates, which is related to the

Cuadro 1. Valores promedio por tipo de frijol nativo para características físicas y de calidad culinaria.

Table 1. Average values by type of bean native to physical characteristics and cooking quality.

Color o tipo	Peso 100 granos (g)	Volumen 100 granos (cc)	Absorción (%)	Testa (%)	Tiempo de cocción (min)	Sólidos en caldo (%)
1. Amarillo	33.4 a	26.2 a	85.56 ab	8.7 i	75 h	0.36 bcdef
2. Negro Opaco	27.5 f	23.2 cde	93.7 a	9.4 cd	71 i	0.38 bcde
3. Negro Brillante	28.2 ef	21.6 f	75.7 bcd	9.2 cde	78 g	0.35 ef
4. Rosado	26.3 f	19.7 g	67.0 cde	9.4 bc	82 ef	0.33 f
5. Bayo	30.6 c	24.1 bc	64.2 de	8.7 i	91 c	0.39 bcd
6. Alubia	14.8 g	13.7 h	70.3 cd	10.1 a	97 b	0.23 g
7. Flor de mayo	28.2 def	23.0 de	74.2 bcd	9.6 b	99 b	0.44 a
8. Café	30.5 c	22.8 e	68.2 cde	9.0 efg	86 e	0.40 ab
9. Conejito	27.7 f	21.8 f	73.1 bcd	8.7 i	80 fg	0.35 def
10. Azufrado	30.3 cd	23.7 bcde	54.3 e	8.7 hi	96 b	0.38 bcde
11. Crema (beige)	32.8 ab	26.4 a	80.5 abc	9.0 fgh	79 g	0.36 cdef
12. Vino	30.8 bc	24.0 bc	93.5 a	9.3 cd	82 ef	0.40 abc
13. Rayado	30.2 cde	24.5 b	79.5 abc	9.2 def	89 d	0.38 bcde
14. Pinto	30.6 c	23.8bcd	76.2 bcd	8.8 ghi	78 h	0.35 ef

Medias con distinta letra en cada columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Sin embargo, algunos genotipos, como el tratamiento 31 (*Ph. vulg.* 1975) (negro brillante) y el tratamiento 110 (*Ph. vulg.* 6) (café brillante-acerado) fueron de cocción rápida (75 min), aun cuando presentaron baja capacidad para absorber agua, lo que se conoce como “testa dura”, mientras que genotipos como el tratamiento 15 (*Ph. vulg.* 4823) (flor de mayo) y el tratamiento 11 (*Ph. vulg.* 1941) (alubia pequeña) embebieron más de 90% de agua, con relación a su peso, y mostraron tiempos de cocción superiores a

taste and consistency. The thicker broths contain more solid and are preferred by the consumers (Jacinto-Hernández *et al.*, 2002b).

On the average protein content, was remarkable also, the wide difference between types (grain color), the color range of groups was 20.7 to 23.8%. The varieties that stood out for their high protein content (> 25.3) were 43 treatment (*Ph. vulg.* 7271), bay type (26.2%) 168 (*Ph. vulg.* 403), sulfur

100 min. Lo anterior demuestra que las características de dureza a la cocción y permeabilidad de la testa pueden ser independientes.

Se observaron diferencias significativas en el espesor del caldo de cocción entre los tipos de frijol. El intervalo en el contenido de sólidos en el caldo estuvo entre 0.22% y 0.60%, lo cual indica una diversidad de opciones en el uso culinario. Éstos resultados coinciden con los reportados por Jacinto y Campos (1993), para variedades mejoradas. A mayor tiempo de cocción los caldos fueron más espesos, lo cual sugiere que cuando el tiempo de cocción se prolonga permite la lixiviación de mayor cantidad de sólidos del grano, principalmente carbohidratos, lo cual se relaciona con el sabor y consistencia. Los caldos más espesos contienen más sólidos y son preferidos por los consumidores (Jacinto-Hernández *et al.*, 2002b).

En cuanto al contenido promedio de proteína, fue notable también la amplia diferencia entre tipos (por color de grano), cuyo intervalo por grupos de color fue de 20.7 a 23.8%. Las variedades que sobresalieron por su alto contenido de proteína, (> 25.3) fueron el tratamiento 43 (*Ph. vulg.* 7 271), tipo bayo (26.2%); el 168 (*Ph. vulg.* 403), tipo azufrado (26 %); 176 (*Ph. vulg.* 2 519), amarillo mostaza (25.3%) y el tratamiento 101 (*Ph. vulg.* 2 346), bayo-claro (25.3%). Dentro de los que presentaron contenidos más bajo (< 19%) de proteína fueron el tratamiento 29 (*Ph. vulg.* 1 069), de color bayo (17.8%) y 18 (*Ph. vulg.* 2 720), negro brillante (18.8%). El bajo contenido de proteína (<19.1%), mostrado por algunos genotipos podría estar asociado con estado nutricional de la población en la zona donde se siembran y consumen esos genotipos. Los valores de proteína detectados coinciden con los reportados por Muñoz *et al.* (2009), quienes para 65 genotipos nativos provenientes del estado de Hidalgo, reportaron de 16.0 a 26.9%.

Análisis de componentes principales con datos de calidad de grano

El análisis de componentes principales (CP), se realizó con datos de las siete características que incluyeron en los atributos físicos, de calidad culinaria y contenido de proteína. Los tres primeros componentes explicaron 81% de la variación total: el primero 39%; el segundo 28%; y el tercero 14%.

En el primer componente, las variables más importantes fueron el peso (0.5772) y volumen de 100 granos (0.5660). Lo anterior indica que el peso y el tamaño del grano, son

type (26%), 176 (*Ph. vulg.* 2519), yellow mustard (25.3%) and treatment 101 (*Ph. vulg.* 2346), bay-clear (25.3%). Among those who had the lowest content (<19%) of protein were 29 treatment (*Ph. vulg.* 1069) of Bayo color (17.8%) and 18 (*Ph. vulg.* 2720), glossy black (18.8%). The low protein content (<19.1%), shown by some genotypes may be associated with nutritional status of the population in the area where they are grown and consumed these genotypes. Detected protein values agree with those reported by Muñoz *et al.* (2009), who for 65 native genotypes from the state of Hidalgo reported 16.0 to 26.9%.

Main component analysis with grain quality data

The main component analysis (CP) was performed with data from the seven characteristics included in the physical attributes of culinary quality and protein content. The first three components explained 81% of the total variation: the first 39%, the second 28% and the third 14%.

In the first component, the most important variables were weight (0.5772) and volume of 100 grains (0.5660). This indicates that the weight and size of the grain are characters that allow discrimination between genotypes. Shown by the high correlation between the two variables that could be used only in grain weight because it is easier to measure. In the second component, the most important variables were grain capacity to absorb water during soaking (- 0.5715) and cooking time (0.5576) and the thickness of the broth (0.4717), these are variables that measure the quality culinary, which is a parameter for commercial acceptance. In component, the three main variables were heavier protein content (0.7993) and the percentage of testa (0.4968).

In Figure 1, consists of two major components, it is observed that the largest number of genotypes is located in quadrants III and IV. While in Quadrant I, is located 23 treatment (*Ph. vulg.* 2712) which is distinguished by its hardness to cooking, treatment 38 (*Ph. vulg.* 7260) and 44 (*Ph. vulg.* 7 278), the latter two large grain (> 55 g per 100 seeds) and intermediate cooking time (73-83 min), the three genotypes have thick broth (> 0.53%) and belong to the race Durango.

In quadrant II, 27 and 32 treatments were placed (*Ph. vulg.* and *Ph. vulg.* 1978. 1954, respectively) from Oaxaca and 17 and 34 treatments (*Ph. vulg.* 4 829 and *Ph. vulg.* 4828), Zacatecas. The grain size of the four genotypes varies from small to medium, exhibit low water absorption capacity and higher cooking time. The solids content in the broth

caracteres que permiten discriminar entre genotipos. Por la alta correlación mostrada entre ambas variables, podría emplearse únicamente el peso del grano por ser más fácil de medir. En el segundo componente, las variables más importantes fueron la capacidad del grano para absorber agua durante el remojo (-0.5715), así como el tiempo de cocción (0.5576) y el espesor del caldo (0.4717), éstas son variables que miden la calidad culinaria, que es un parámetro determinante para la aceptación comercial. En el componente principal tres, las variables de mayor peso fueron el contenido de proteína (0.7993) y el porcentaje de testa (0.4968).

En la Figura 1, conformada por dos componentes principales, se observa que el mayor número de genotipos se ubica en los cuadrantes III y IV. Mientras que en el cuadrante I, se ubican el tratamiento 23 (*Ph. vulg.* 2 712) que se distingue por su dureza a la cocción; el tratamiento 38 (*Ph. vulg.* 7 260) y el 44 (*Ph. vulg.* 7 278); éstos dos últimos de grano grande (>55g por 100 semillas) y de tiempo de cocción intermedio (73-83 min); los tres genotipos presentan caldo espeso (>0.53 %) y pertenecen a la raza Durango.

En el cuadrante II, se ubicaron los tratamientos 27 y 32 (*Ph. vulg.* 1 978 y *Ph. vulg.* 1 954, respectivamente) provenientes de Oaxaca y los tratamientos 17 y 34 (*Ph. vulg.* 4 829 y *Ph. vulg.* 4 828), de Zacatecas. El tamaño de grano de los cuatro genotipos varía de pequeño a mediano, muestran baja capacidad para absorber agua y alto tiempo de cocción. El contenido de sólidos en el caldo de los genotipos *Ph. vulg.* 1 978 y la *Ph. vulg.* 1 954 es bajo (<0.27 %), mientras que el de *Ph. vulg.* 4 829 y *Ph. vulg.* 4 828 es superior (0.39 y 0.40% respectivamente).

En el cuadrante III el único que se separa es el tratamiento 64 (*Ph. vulg.* 7 273), alubia con alta capacidad para absorber agua, tiempo de cocción moderado y escaso contenido de sólidos en el caldo de cocción. Finalmente en el cuadrante IV el tratamiento 101 (*Ph. vulg.* 2 346), con grano beige, se separa de los demás por sus características de tamaño grande (40 g por 100 semillas), alta capacidad para absorber agua, rápida cocción (67 min), alto contenido de sólidos (0.47%), y además presenta bajo contenido de testa (8.9%) y alto contenido de proteína (25.3%), atributos que lo ubican como de calidad culinaria y nutricional sobresaliente.

El agrupamiento jerárquico, con los datos de calidad del grano, definió tres grupos. El primero formado por 34 genotipos, el segundo por 71 y el tercero por seis genotipos. El dendrograma obtenido con los datos de calidad mostró

of genotypes *Ph. vulg.* 1978 and *Ph. vulg.* 1954 is low (<0.27%), while the *Ph. vulg.* 4 829 and *Ph. vulg.* 4828 is higher (0.39 and 0.40% respectively).

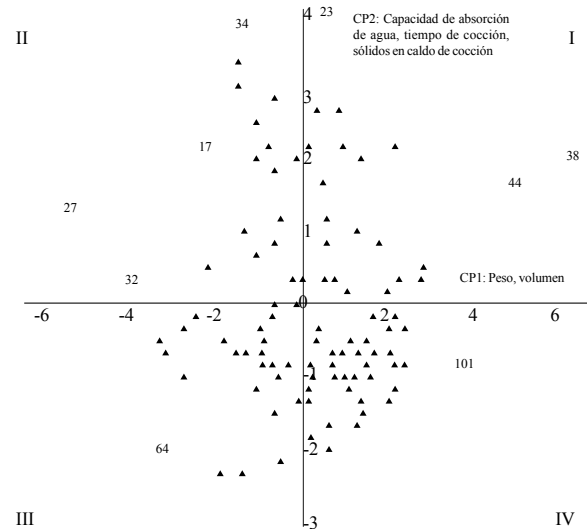


Figura 1. Distribución de 111 genotipos nativos y una variedad mejorada de frijol con base en los dos primeros componentes principales (CP) de siete variables de calidad del grano.

Figure 1. Distribution of 111 genotypes native and improved bean variety based on the first two main components (PC) of seven variables of grain quality.

In quadrant III, the only thing separating them is the treatment 64 (*Ph. vulg.* 7 273), beans with high capacity to absorb water, cooking time moderate and low content of solids in the cooking broth. Finally quadrant IV treatment 101 (*Ph. vulg.* 2 346), with grain beige, others are separated by virtue of their large size (40 g per 100 seeds), high capacity to absorb water, fast cooking (67 min), high solids (0.47%), and also has low head (8.9%) and high protein content (25.3%), attributes that place it as culinary and nutritional quality outstanding.

The hierarchical clustering, with grain quality data, defined three groups. The first consists of 34 genotypes, the second by 71 and the third of 6 genotypes. The dendrogram obtained with the quality data groups showed a separation associated with the grain size, the cooking quality and the geographical origin of the genotypes.

Cluster analysis of the two types of beans with the highest number of genotypes

In order to determine the variability between genotypes of the same color of grain was analyzed separately mustard genotypes 22 and 25 in black, including

una separación de grupos asociada con el tamaño del grano, la calidad culinaria y también con el origen geográfico de los genotipos.

Análisis de agrupamiento de los dos tipos de frijol con mayor número de genotipos

Para determinar la variabilidad entre genotipos de un mismo color de grano se analizaron por separado los 22 genotipos amarillo mostaza y los 25 de color negro, incluidos brillantes y opacos, que representan los grupos con más individuos, tanto en los datos RAPD como en los de calidad.

En la Figura 2 se observa que en el agrupamiento por similitud genética de 22 genotipos de color amarillo mostaza se conformaron dos grupos, el I de seis genotipos y el II de 16. En el I se ubicaron cercanos entre sí los tratamientos 10 y 26 (*Ph. vulg.* 2 703 y *Ph. vulg.* 2 719), ambos de Veracruz y el 38 (*Ph. vulg.* 7 260) proveniente de Aguascalientes; así como los tratamientos 74, 88 y 93 (*Ph. vulg.* 2 857, *Ph. vulg.* 3 760 y *Ph. vulg.* 2 534) del estado de Puebla. En el grupo II se ubicaron genotipos de los estados de Puebla, uno de Hidalgo, y Estado de México.

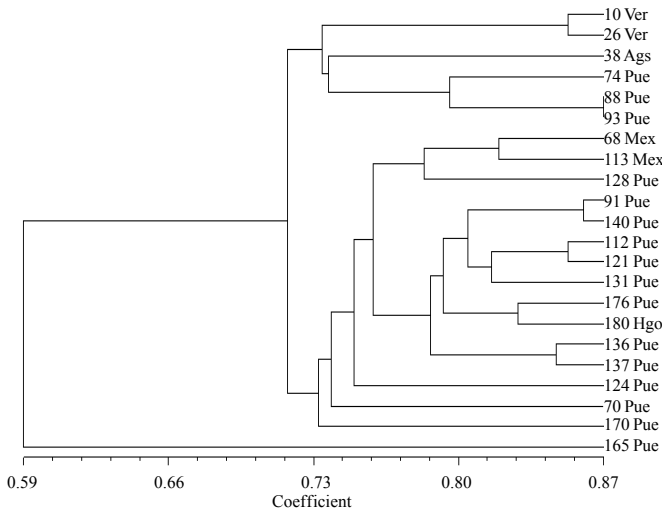


Figura 2. Agrupamiento UPGMA de coeficientes de similitud genética (Jaccard) de 22 genotipos nativos de frijol amarillo mostaza basado en datos RAPD.

Figure 2. UPGMA clustering of genetic similarity coefficients (Jaccard) of 22 native genotypes mustard yellow bean data based on RAPD.

En el dendrograma generado con los datos de calidad de grano (Figura 3), a semejanza del obtenido con datos RAPD, se conformaron también dos grupos con similar distribución de tratamientos.

shiny and opaque, which represent groups most individuals, both in the data and in those of RAPD quality.

The Figure 2 shows that the genetic similarity grouping of 22 genotypes of yellow mustard to two groups, I with six genotypes and II with 16. In the I we placed in proximity to each other 10 and 26 treatments (*Ph. vulg.* 2703 and *Ph. vulg.* 2719), both of Veracruz and 38 (*Ph. vulg.* 7260) from Aguascalientes 74, 88 and 93 (*Ph. vulg.* 2857, *Ph. vulg.* 3760 and *Ph. vulg.* 2534) the State of Puebla. In group II genotypes were located in the States of Puebla, one of Hidalgo and State of Mexico.

In the dendrogram generated with the grain quality data (Figure 3), similar to the data obtained with RAPD, two groups were formed also with similar distribution of treatments.

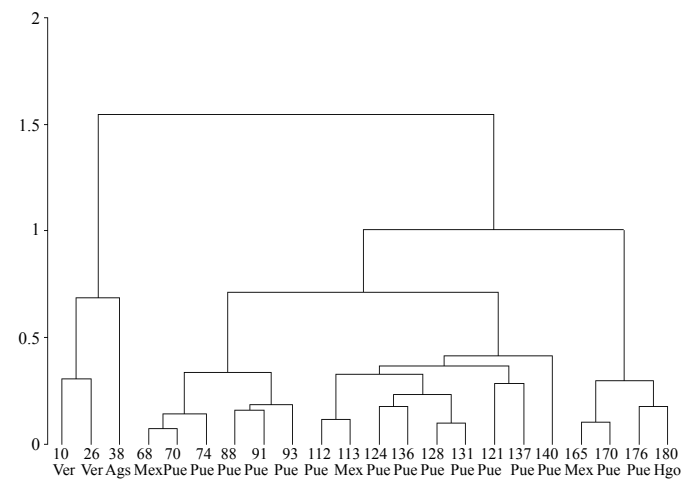


Figura 3. Dendrograma de 22 genotipos nativos de frijol amarillo mostaza, con base en el análisis de agrupamiento jerárquico con datos de calidad de grano.

Figure 3. Dendrogram of 22 genotypes native mustard yellow bean, based on hierarchical clustering analysis with grain quality data.

The mustard yellow beans group showed a variety of sizes was 27.8 to 53.6 grams per 100 seeds, cooking time between 58 and 126 min, broth thickness from 0.29 to 0.60% solids, protein content 19.6 to 26.2%. This variability allow for selection of genotypes with agronomic characteristics and to introduce them to outstanding nutritional localities are preferred to improve the production and nutritional intake without changing consumer preferences.

El grupo de frijoles de color amarillo mostaza, mostró una diversidad de tamaños que fue de 27.8 a 53.6 gramos por 100 semillas, tiempo de cocción entre 58 y 126 min, espesor del caldo desde 0.29 a 0.60% de sólidos; contenido de proteína de 19.6 a 26.2%. Esta variabilidad permitiría una selección de genotipos con características agronómicas y nutrimentales sobresalientes para introducirlos a localidades donde sean preferidas para mejorar la producción y el aporte nutrimental, sin modificar las preferencias de los consumidores(as).

El segundo grupo por su tamaño (18.9% del total) fue el de color negro brillante, que en conjunto con el negro opaco (3.6% del total), presentaron un 17.3 a 39.3 gramos por 100 semillas, tiempo de cocción entre 55 y 101 min, espesor del caldo desde 0.24 a 0.51% de sólidos; contenido de proteína de 18.8 a 24.8%.

El agrupamiento de los genotipos de color negro con base en los datos RAPD fue influido por el origen geográfico, los genotipos del estado de Puebla, y Estado de México se ubicaron cercanos y mezclados entre sí, mientras que los de Veracruz, Chiapas, Oaxaca y Aguascalientes se localizaron cercanos entre sí pero separados de los de Puebla y Estado de México. El dendrograma obtenido con los datos de calidad de grano mostró una agrupación semejante, con dos grupos, en el I se ubicaron los genotipos de Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Aguascalientes y uno de Puebla mientras que en el II los de México y Puebla y sólo uno de distinta procedencia; el tratamiento 67 (*Ph. vulg.* 7352) proveniente de Querétaro.

Conclusiones

Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre tipos en cuanto a la forma y tamaño de grano, tiempo de cocción, espesor del caldo y contenido de proteína. Algunas variedades con características sobresalientes para ser utilizadas como progenitores en los programas de mejoramiento por sus atributos de calidad culinaria y contenido de proteína son los tratamientos 101 (*Ph. vulg.* 2346, beige), 168 (*Ph. vulg.* 403, azufrado), 145 (*Ph. vulg.* 2435, bayo) y 176 (*Ph. vulg.* 2519, amarillo mostaza).

La influencia del origen geográfico en la agrupación con los datos de marcadores RAPD, como con datos de calidad culinaria sugiere que ha existido recombinación genética entre los frijoles nativos, aun cuando presentan diferencias morfológicas. Asimismo la selección realizada por los

The second group in size (18.9% of total) was glossy black, which together with opaque black (3.6% of the total) had a 17.3 to 39.3 grams per 100 seeds, cooking time between 55 and 101 min broth thickness from 0.24 to 0.51% solids, protein content 18.8 to 24.8%.

Grouping the black color genotypes based on RAPD data was influenced by the geographical origin, the genotypes of the state of Puebla, and Mexico City were located near and mixed together, while Veracruz, Chiapas, Oaxaca and Aguascalientes is located close to each other but separated from Puebla and Mexico State. The dendrogram obtained with grain quality data showed a similar grouping, with two groups in the genotype I were located in Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Puebla, Aguascalientes and one while in the II those of Mexico and Puebla and only one of different sources, treatment 67 (*Ph. vulg.* 7352) from Querétaro.

Conclusions

Statistically significant differences were detected between types; shape and size of grain, cooking time, thickness of the broth and protein content. Some varieties with outstanding characteristics to be used as parents in breeding programs for their cooking quality attributes and protein content are the treatments 101 (*Ph. vulg.* 2346, beige), 168 (*Ph. vulg.* 403 sulfur), 145 (*Ph. vulg.* 2435, bayo) and 176 (*Ph. vulg.* 2519, yellow mustard).

The influence of geographical origin in the group with RAPD data as culinary quality data suggests that there has been genetic recombination between native beans, although morphological differ. Also the selection made by farmers using grain morphological characteristics, and establishes environmental influence differences in grain quality attributes between different provenance.

Since among native genotypes of the same color some stand out for their protein content, it would be possible to introduce more varieties of nutrient supply in some regions without changing eating habits in regions with malnutrition.



campesinos usando características morfológicas del grano, y la influencia del ambiente establece diferencias en los atributos de calidad del grano entre variedades de diferente procedencia.

Dado que entre los genotipos nativos de un mismo color algunos sobresalen por su contenido de proteína, sería posible introducir variedades de mayor aporte nutrimental en algunas regiones sin modificar los hábitos alimenticios, en las regiones con problemas de desnutrición.

Literatura citada

- Afanador, L. K.; Haley, S. D.; Kelly, J. D. 1993. Adoption of a "mini-prep" DNA extraction method for RAPD marker analysis in common bean. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 36:10-11.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 1984. *Official Methods of Analysis*. 14th (Ed.). Section 2.057: Arlington, VA. 1135.
- Bushey, S. M.; Hosfield, G. L.; Owens, S. 2002. The role of the epicuticular wax layer in water movement across the bean seed coat. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 45:12-13.
- Cárdenas-Ramos, F. A.; Muruaga-Martínez, J. S. Y Acosta-Gallegos, J. A. 1996. Catálogo Banco de Germoplasma de *Phaseolus* spp. del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) 421 p.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1984. Morfología de planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Guía de estudio para ser usada como complemento de la unidad audiotutoria sobre el mismo tema. Contenido científico: Debouck, D. G. e Hidalgo, R. (Ed.). Ospina O. F.; Cali, Colombia. CIAT 56 p.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. van Schoonhoven, A. y Pastor-Corrales, M. A. (Comps.). Cali Colombia. 56 p.
- Díaz, R.; Ramírez, R. y Paredes, A. 2008. Diversidad de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado en diferentes regiones del estado de Puebla. *In: seguridad alimentaria en Puebla: prioridad para el desarrollo*. Secretaría de Desarrollo Rural del Gobierno del Estado de Puebla, Colegio de Postgraduados *Campus Puebla*. Editorial Altres Costa-Amic, México. 225-235 pp.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) México, D. F., 217 p.
- Gepts, P. and Debouck, D. 1991. Origin, domestication and evolution of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *In: van Schoonhoven, A. and Voysest, O. (Eds.). Common beans; research for crop improvement*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 7-53 pp.
- Guzmán, H.; Jacinto, C. y Castellanos, J. 1995. Manual de metodologías para evaluar calidad de grano de frijol. Secretaría de Agricultura y Ganadería (SAGAR)- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)- Centro de Investigación Regional de la Región Centro (CIRCE). 275 p.
- Jacinto-Hernández, C.; Hernández-Sánchez, H.; Azpiroz-Rivero, H. S.; Acosta-Gallegos, J. A. y Bernal-Lugo I. 2002a. Caracterización de una población de líneas endogámicas de frijol común por su calidad de cocción y algunos componentes nutrimentales. *Agrociencia*. 36:451-459.
- Jacinto-Hernández, C.; Bernal-Lugo, I. and Garza-García, R. 2002b. Food quality of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from different states of Mexico. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 45: 222-223.
- Jacinto-Hernández, C.; Hernández-Sánchez, H.; Azpiroz-Rivero H. S.; Acosta-Gallegos, J. A. y Bernal-Lugo, I. 2003. Genetic analysis and randomly amplified polymorphic DNA markers associated with cooking time in common beans. *Crop Sci.* 43:329-332.
- Jacinto-Hernández, C. y Campos-Escudero, A. 1993. Efecto de la cocción sobre algunas características nutricionales del frijol. *Rev. Agron. Mesoam.* 4:42-47.
- Muñoz-Velázquez, E. E.; Rubio-Hernández, D.; Bernal-Lugo, I.; Garza-García, R. y Jacinto-Hernández, C. 2009. Caracterización de genotipos nativos de frijol del estado de Hidalgo, con base a calidad del grano. *Agríc. Tec. Méx.* 35(4):426-435.
- Breña, P. A. F. 2004. Precipitación y recursos hidráulicos en México. Universidad Autónoma Metropolitana (UAM). <http://www.uamenlinea.uam.mx/materiales/licenciatura/hidrologia/precipitacion/PRHM04-libro.pdf>. (consultado noviembre, 2012).
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). 2008. Estadísticas del agua en México. Precipitación pluvial normal mensual por entidad federativa, periodo de 1971-2000. Ed. Secretaría del medio ambiente y recursos naturales. México. http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/publicaciones/publicaciones/EAM_2008.pdf. (consultado noviembre, 2012).
- Ramírez-Pérez, A. R.; Díaz-Ruiz, R.; Jacinto-Hernández, C.; Paredes-Sánchez, J. A. y Garza-García, R. 2012. Diversidad de frijoles nativos de diferentes regiones del estado de Puebla. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 3(3):467-480.
- Rohlf, F. J. 2002. NTSYS-pc: numerical taxonomy system ver. 2.1. Exeter Publishing Ltd., Setauket, New York.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2008. Subdirección de Información Geográfica. Comportamiento histórico de la precipitación mensual y acumulada 1999-2008 enero-diciembre. http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/monitor/gas/com_prec_nov08.pdf. (consultado diciembre, 2012).
- Singh, S. P.; Gepts, P. and Debouck, D. 1991. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) *Econ. Bot.* 45(3):379-396.
- Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: Freeman. 573 p.
- Statistical Analysis Systems Institute (SAS Institute). 1999. The SAS for windows version eight. SAS Institute Inc. Cary, N.C., USA. 1028 p.