



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de tres genes candidatos tolerantes a sequía: *ASR*, *DREB2* y *ERECTA* en frijol tépari *Phaseolus acutifolius*.

María Angélica Buitrago Bitar

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Sede Palmira
Palmira Valle del Cauca, Colombia
2017

Evaluación de tres genes candidatos tolerantes a sequía: *ASR*, *DREB2* y *ERECTA* en frijol tépari, *Phaseolus acutifolius* A. Gray.

María Angélica Buitrago Bitar

Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Biológicas

Directora:

Ph.D. Ligia Carmenza Muñoz Flórez

Codirectores:

Ph.D. Jaime Eduardo Muñoz Flórez

Ph.D. Matthew W. Blair

Línea de Investigación:

Biotecnología vegetal

Grupo de Investigación:

Diversidad Biológica

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Sede Palmira
Palmira Valle del Cauca, Colombia
2017

Agradecimientos

A mi mamá por su invaluable apoyo en todos los proyectos que emprendo tanto en mi vida personal como profesional, a mis hermanas por ser comprensivas, A Jorge M. Londoño por brindarme su compañía, su apoyo y enseñanzas.

A la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA), Viena (Austria), Quien financio el proyecto “heat effects in tepary beans and its relatives” del cual es parte la presente investigación. Al grupo de Diversidad Biológica. A los compañeros del proyecto de Regalías, Y en general a todas las personas que me colaboraron de alguna u otra forma para la culminación de este trabajo.

Resumen

Phaseolus acutifolius A. Gray (frijol tépari) es una especie de origen Mesoamericano cuyos ambientes de desarrollo son principalmente xerofíticos, característica que le brinda adaptabilidad y tolerancia a estrés hídrico. Esta cualidad proyecta al frijol tépari como un cultivo de importancia, ya que contiene una fuente importante de proteína de fácil y rápido acceso. El objetivo del presente trabajo fue identificar genes candidatos de tolerancia a sequía en frijol tépari, y es considerado un óptimo modelo para la evaluación de los genes: *Asr* (ABA-Stress Response), *Dreb2* (Drought-Responsive Element Binding) y *ERECTA* (LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase). Dada su cualidad de ser tolerante natural a sequía. Se evaluaron 55 accesiones de la colección de *P. acutifolius*, entre los cuales se consideraron las formas silvestres y cultivadas, y un pariente silvestre de la especie *Phaseolus parvifolius*; Además se incluyeron 4 genotipos de *Phaseolus vulgaris* como controles positivos. Se analizaron las regiones codificantes en los tres genes y se encontró que *Dreb2B* fue el más polimórfico de los tres y *ERECTA* el gen más conservado. En los análisis haplotípicos *ASR2* tuvo 4 haplotipos, *Dreb2B* 15 haplotipos y *ERECTA* 6 haplotipos, este último con baja diferenciación entre las especies, ya que solo se encontró un cambio mutacional. En los tres genes se encontraron variantes SNPs que en su mayoría fueron sinonimias soportándose la baja tasa de cambio de los aminoácidos que codifican las proteínas, por lo tanto las tasas evolutivas son iguales a la tasa de mutación neutra, indicando la posible importancia en la funcionalidad de dicha proteína. Este es el primer reporte de evaluación de genes candidatos tolerantes a sequía en esta especie por lo que se validan la presencia de estos y por lo tanto la posible relación con la respuesta fisiológica de la especie a ambientes con déficit hídrico.

Palabras clave: Adaptación, cambio climático, estrés, mejoramiento, *Phaseolus vulgaris*,

Abstract

Phaseolus acutifolius A. Gray (Tepary Bean) is a species of Mesoamerican origin whose environments of development are mainly xerophytic, being a characteristic that provides adaptability and tolerance to water stress. This quality projects to tepary bean as an important crop, since it contains an important source of protein easily accessible. In the present study, candidate tolerant genes for drought tolerance were evaluated in tepari bean, which is considered an optimal crop model for the evaluation of *Asr* (ABA stress response), *Dreb2* (binding of the drought responsive element) and *ERECTA* (LRR receptor such as serine / threonine protein kinase) genes. Due to the quality of this species, being natural tolerant for drought stress, the present research focuses in the evaluation of 55 *Phaseolus acutifolius* genotypes from CIAT's whole germplasm collection, including wild and cultivated relatives. Sister species *Phaseolus parvifolius* and 4 *Phaseolus vulgaris* genotypes were included in the analysis. Also exons were analyzed in all three genes indicating as *Dreb2B* as the most polymorphic of all three genes, *ERECTA* was the most conserved gene with low levels of polymorphism detected across species. The haplotype analyzes for *ASR2* showed 4 variants, *Dreb2B* 15, and *ERECTA* 6 haplotypes; the latter with low differentiation between species and only one mutational change was found. In the three genes SNPs variants were found that were mostly synonymous to support the low rate of change of the amino acids that encode the proteins, therefore the evolutionary rates are equal to the mutation rate neutral, indicating the possible important functionality of said Protein This is the first report of the evaluation of tolerant candidate genes a drought in this species by which they validate the presence of these and therefore the possible relationship with the physiological response of the species to environments with water deficit.

Key words: Adaptation, climate change, stress, genes, breeding, *Phaseolus vulgaris*, drought.

Tabla de Contenido

Agradecimientos	III
Resumen	4
Abstract	5
Tabla de Contenido.....	6
Lista de Figuras	8
Lista de Tablas.....	10
Introducción.....	12
1 Capítulo 1	14
Marco Teorico y Metodología	14
1.1. Marco Teórico.....	15
1.1.1. Generalidades	15
1.1.2. Origen	16
1.1.3. Descripción de la especie	18
1.1.4. Importancia del Cultivo de Frijol	18
1.1.5. Cambio climático	19
1.1.6. Mecanismos de tolerancia a sequía en plantas	20
1.1.7. Marcadores genéticos.....	21
1.1.8. Genes candidatos	23
1.1.9. Genes candidatos tolerantes a sequía	24
1.2. Metodología	29
1.2.1. Población de estudio.....	29
1.2.2. Extracción de ADN y amplificación de los genes candidatos de tolerancia a sequia 29	
1.2.3. Secuenciación de ADN y análisis genéticos	30
1.2.4. Ubicación de los genes candidatos de tolerancia a sequía en el genoma de referencia.....	32

2. Capítulo 2	33
Resultados y Discusión	33
2.1. RESULTADOS	34
2.1.1. Gen ASR2	34
2.1.2. Gen <i>Dreb2B</i>	44
2.1.3. Gen ERECTA	55
2.2. DISCUSIÓN	68
3. Conclusiones y Recomendaciones	76
3.1. Conclusiones	77
3.2. Recomendaciones	78

Lista de Figuras

Figura 1. Alineamiento de región completa del gen ASR2 en las especies estudiadas.....	34
Figura 2. Alineamiento de la región codificante: exón 1 y exón 2 en todas las especies.....	35
Figura 3. Alineamiento de la región codificante de aminoácidos exón 1 y exón 2.....	35
Figura 4. Red Haplotípica para el gen ASR2 con las especies involucradas en cada haplotipo.	37
Figura 5. Red Haplotípica considerando la región geográfica para las muestras	38
Figura 6. Análisis de Coordenadas Principales	40
Figura 7. Gráfica en 3 dimensiones de la diferenciación genética entre los individuos de <i>Phaseolus</i> para el gen ASR2.	41
Figura 8. Análisis de Diversidad Neighbor-Joining	42
Figura 9. Análisis de Máxima Verosimilitud de tres especies de <i>Phaseolus</i>	43
Figura 10. Alineamiento de las especies de <i>Phaseolus</i> con la secuencia de referencia.....	44
Figura 11. Alineamiento de <i>Phaseolus acutifolius</i> silvestre y <i>Phaseolus parvifolius</i> que tienen una inserción de tres nucleótidos (codón) sin cambio de lectura de aminoácidos	45
Figura 12. Alineamiento de secuencias con inserción de codón, las flechas azules indican cambios en aminoácidos y la flecha roja indica donde ocurre la inserción del codón.....	46
Figura 13. Red Haplotípica para el gen Dreb2B	48
Figura 14. Red Haplotípica considerando la región geográfica para las muestras	49
Figura 15. Análisis de Coordenadas Principales Dreb2B.....	51
Figura 16. Gráfica en 3 dimensiones de la diferenciación genética entre los individuos de <i>Phaseolus</i> para el gen Dreb2B.....	53
Figura 17. Análisis de Diversidad de Neighbor-Joining	54
Figura 18. Análisis de Máxima Verosimilitud	55
Figura 19. Ubicación del Gen ERECTA en el cromosoma 1 de <i>Phaseolus vulgaris</i>	56
Figura 20. Alineamiento con fragmento de RNAm de <i>Phaseolus vulgaris</i> del Gen ERECTA....	57
Figura 21. Alineamiento de la región codificante: exón 1, exón 2, exón 3 y exón 4, para todas las especies	57

Figura 22. Red Haplotípica para el gen ERECTA.....	59
Figura 23. Red Haplotípica considerando la región geográfica para las muestras para el gen ERECTA.....	60
Figura 24. Gráfica del Análisis de Coordenadas Principales.....	63
Figura 25. Análisis de Coordenadas Principales de acuerdo a la Distancia Genética de Nei...	64
Figura 26. . Gráfica en 3 dimensiones de la diferenciación genética entre los individuos de <i>Phaseolus</i> para el gen ERECTA	65
Figura 27. Análisis de Diversidad de Neighbor-Joining gen ERECTA	66
Figura 28. Análisis de Máxima Verosimilitud de tres especies de <i>Phaseolus</i>	67

Lista de Tablas

Tabla 1. Diversidad Haplotípica determinada por grupos de especies	36
Tabla 2. Comparación de la Composición Nucleotídica entre las especies de <i>Phaseolus</i> . Porcentaje de Timina (T), Citosina (C) Adenina (A), Guanina (G). Número total de nucleótidos.	39
Tabla 3. Distancias entre grupos por composición aminoacídica.	39
Tabla 4. Distancia Genética de Nei entre las poblaciones de <i>Phaseolus</i>	41
Tabla 5. Diversidad Haplotípica determinada por grupos de especies	48
Tabla 6. Variación de cada nucleótido en las secuencias de <i>Phaseolus</i>	50
Tabla 7. Distancia Genética de Nei por poblaciones	52
Tabla 8. Diversidad Haplotípica determinada por grupos de especies	58
Tabla 9. Comparación de la Composición Nucleotídica entre las especies de <i>Phaseolus</i> . Porcentaje de Timina (T), Citosina (C) Adenina (A), Guanina (G). Número total de nucleótidos.	61
Tabla 10. Análisis de Distancias entre grupos por Composición Aminoacídica	62
Tabla 11. Distancia de Nei por poblaciones.....	64

Introducción

Las leguminosas, representan la fuente de alimentos más valorados en la agricultura después de los cereales. Los granos son ricos en proteína siendo una fuente importante de nutrientes para la dieta humana, especialmente para poblaciones del sub-trópico. A pesar de ser un cultivo de gran extensión, la productividad es baja y ha disminuido en las últimas décadas, debido a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico. Entre los factores bióticos: *Colletotrichum lindemuthianum* (antracnosis), *Phaeoisariopsis griseola* (mancha angular), *Uromyces appendiculatus* (roya), *Xanthomonas axonopodis* (tizón bacteriano) son los de mayor importancia. Para cultivos como *Glycine max* (soya), *Arachis hypogaea* (maní), *Cicer arietinum* (garbanzo) y *Phaseolus vulgaris* (frijol común) la sequía es un causante de estrés abiótico con consecuencias relevantes (Varshney & Kudapa 2013). Por otra parte el cambio climático es otro factor importante causante potencial de la disminución en la productividad de los cultivos (Varshney *et al.* 2010)(Cortés *et al.* 2012).

Basándose en las limitaciones y las predicciones sobre la disminución de las lluvias, es conveniente aprovechar la variabilidad genética y la aplicación del conocimiento para procesos de mejoramiento genético en frijol, aplicados a diferentes tipos de estrés asociados al cambio climático. El frijol, comparado con otras leguminosas, está menos adaptado a ambientes extremos o de bajas precipitaciones, altas temperaturas, baja fertilidad en los suelos o acidez de los mismos; sin embargo, los acervos genéticos y las múltiples razas que difieren en rangos adaptativos son una fuente de recursos genéticos valorables para los cultivares (Beebe *et al.* 2011).

Phaseolus acutifolius o frijol tépari pertenece al acervo genético terciario del frijol común (Debouck 1999), ésta especie es un cultivo tradicional de las regiones desérticas y semiáridas de México y al sur este de los Estados Unidos. (Stephens 2015), pocas accesiones son encontradas en Arizona y Nuevo México, como también en Guanacaste provincia de Costa Rica en América central (Debouck 1991).

El cultivo de frijol tépari se considera tolerante a sequía pero descuidado región de América entre el Norte y Centro América y comercialmente es calificado de menor importancia, comparado con el frijol común; aunque posee un número de características favorables; presenta resistencia a enfermedades y patógenos (Urrea *et al.* 1999; Muñoz *et al.* 2004); potencial de adaptación a ambientes poco favorables, como tolerancia a sequía y a suelos salinos, además de presentar un estado de maduración temprana (Blair *et al.* 2012). Los efectos de la falta de irrigación hídrica, sobre el frijol común dependen de la intensidad, tipo y duración del estrés; Por lo tanto, el desarrollo de variedades de frijol adaptados a sequía es una estrategia importante para minimizar las pérdidas en los cultivos y mejorar la seguridad alimentaria en las regiones afectadas por el cambio climático (Rao *et al.* 2013).

La tolerancia a sequía es una característica cuantitativa que incluye componentes genéticos, epigenéticos y ambientales, modulados por un juego de factores de transcripción que pueden estar caracterizados o no.(J. Cortés *et al.* 2012).

La respuesta de las plantas a la sequía es bastante complejo e involucra cambios fisiológicos, como disminución de la fotosíntesis y apertura de los estomas. Por lo tanto la investigación en la fisiología relacionada con este estrés ha sido muy importante. (Maskin *et al.* 2001). En la investigación de genes relacionados con respuesta a sequía han sido caracterizados algunos de estos, los cuales resultan ser componentes de las vías de señalización de la transducción involucradas en la adaptación al estrés hídrico (Frankel *et al.* 2006).

El frijol tépari es originario de áreas secas y desiertos por lo tanto se encuentra bien adaptado al estrés por sequía, entre los mecanismos de respuesta al estrés por sequía, se pueden encontrar raíces profundamente agrupadas y finas para la obtención de reservas de agua rápidamente, hojas pequeñas y control de estomas. Considerando esta especie de frijol como potencial fuente de proteína en la alimentación, para el cultivo en suelos pobres, expuestos a estrés por agua, o desertificados, es una alternativa para la mitigación del hambre en áreas vulnerables que afecten la seguridad alimentaria (Rao *et al.* 2013).

1 Capítulo 1

Marco Teorico y Metodología

1.1. Marco Teórico

1.1.1. Generalidades

Las leguminosas son el segundo cultivo más importante después de los cereales, basándose en la superficie cosechada y la producción total; se producen más de 300 millones de toneladas métricas de leguminosas que corresponden a 190 millones de hectáreas, cerca del 13% del total de área de cultivo (Gepts *et al.* 2005).

Dentro de las principales leguminosas de grano se encuentra el frijol común *Phaseolus vulgaris*, arveja *Pisum sativum L.*, garbanzo *Cicer arietinum L.*, haba *Vicia faba L.*, guandú *Cajanus cajan L.*, frijol cabecita negra (*Vigna unguiculata L.*) y la lenteja (*Lens esculentum L.*), todas estas leguminosas constituyen el 33% de las necesidades de proteínas en la dieta de los humanos. Por otra parte, las leguminosas de grano, principalmente de soja *Glycine max L.* y maní *Arachis hypogaea L.*, también son una fuente importante para el aceite vegetal, proporcionando más de 35% del aceite vegetal procesado del mundo (Gupta & Nadarajan 2014).

El cultivo de las leguminosas se encuentra ampliamente extendido en regiones secas o semiáridas del mundo, por lo general bajo temporadas de lluvias, y en menos proporción por irrigación agrícola. Las leguminosas a diferencia de otras plantas tienen ciertas características únicas como fijación simbiótica de nitrógeno, fisiología rica en proteínas, metabolismo secundario (Varshney & Kudapa 2013).

El frijol común, es uno de los cultivos más antiguos del nuevo mundo. Es muy diverso en métodos de cultivo, usos, ambientes y alta variabilidad morfológica. Representantes del genero *Phaseolus* pueden ser encontrados desde cero hasta 3000 m.s.n.m; son cultivados en monocultivo, en asociaciones o en rotación; sus recursos genéticos son una matriz compleja de acervos genéticos mayores y menores, razas y tipos intermedios, con introgresión ocasional entre tipos silvestres y domesticados, por lo tanto es un cultivo que se adapta a muchos nichos, con diferencias tanto por preferencias agronómicas como de consumo (Broughton *et al.* 2003).

A pesar de que el frijol común puede encontrarse en variedad de entornos, se encuentra poco adaptado a ambientes extremos con bajas precipitaciones; por lo tanto, la sequía afecta cerca del 60% de la producción de frijol; aunque hay razas consideradas de resistencia a la sequía como Durango, también existen otras especies del género *Phaseolus* que ofrecen una alternativa a este problema. *P. acutifolius* A. Gray, frijol tépari, es cultivado en áreas de pocas precipitaciones y poca irrigación hídrica, por cual se encuentra adaptada a estrés. Los cruzamientos con esta especie han sido usados como fuente de genes para mejoramiento del frijol común mediante retrocruzamientos y rescate de embriones (Rao *et al.* 2013).

Las plantas silvestres de frijol tépari, son enredaderas que pueden medir hasta 3 metros de largo, lo que les permite subirse a los arbustos encontrados en desiertos. Las variedades cultivadas son de tipo arbustivo, o en ocasiones semi- enredaderas, que crecen a una altura media de aproximadamente 76,2 cm. Las hojas son trifoliadas puntiagudas, las vainas son cortas de aproximadamente 7,6 cm de largo, ligeramente vellosas y verdes. Cuando las vainas se secan son de color beige claro. Las semillas, por lo general son cinco o seis por vaina, varían en color y son parecidas a un frijol pequeño en forma de media luna o frijol blanco (Stephens 2015).

1.1.2. Origen

La distribución de variedades silvestres está fuertemente concentrada en desiertos marginales semi-áridos de Sonora y Chihuahua, los cuales son encontrados como diferentes tipos vegetativos. Tépari silvestre variedad *tenuifolius* tiene un rango de elevaciones de 200 hasta 1500 m.s.n.m, y también se encuentra en bosques tropicales deciduos y bosques de pino. La variedad *acutifolius* tiene un rango de elevaciones de hasta 2000 m.s.n.m, estas dos variedades tienden a “especializarse” en hábitats particulares; por otra parte se ha reconocido una región binacional de Aridoamérica como el centro de diversidad de las razas locales de tépari, y como centro geográfico de la variabilidad de frijol tépari silvestre y variedades locales recientemente domesticadas. Considerando la diversidad de las poblaciones domesticadas y silvestres del frijol tépari en esta región, originaria cerca del extremo sureste de esta zona, y teniendo en cuenta las evidencias arqueológicas de la presencia de tépari domesticados, por fuera de un área de rápida difusión, puede argumentarse que tépari probablemente ha sido domesticado en Aridoamérica, y por lo tanto se rechaza que tépari tuvo múltiples centros de origen o un origen no centrado, y que se extiende desde Guatemala a Sonora en México (Pratt & Nabhan 1988).

Un estudio realizado con la isoenzima Aco-2 se obtuvo diferencias significativas en las frecuencias génicas entre las formas silvestres y domesticadas de tépari, y una variabilidad genética baja en la proteína de la faseolina, por lo que proponen se debe a un efecto fundador en los tépari. Por otra parte en los tepari cultivado se reporta la fijación de un alelo raro para el gen de la isoenzima Aco-2, lo cual se propone se produjo desde la domesticación de tépari silvestre que se fue fijando y creó un distanciamiento genético entre ellos, la evidencia de estos cambios se ha definido en cuanto a la diferencia en algunos caracteres como el tamaño de la semilla, color variable de la testa, dehiscencia reducida entre otros. Considerando este evento y el cuello de botella en la especie, se propone acerca de la domesticación de la especie, que se lo que sugiere un solo evento geográfico en el cual participen dos o más eventos independientes que conducen a diferencias en las frecuencias alélicas entre silvestres y cultivados, así como también la domesticación independiente de *Phaseolus acutifolius* en diferentes regiones geográficas. (Garvin & Weeden 1994).

En el estudio de taxonomía de *P. acutifolius* se soportó la ocurrencia de un solo evento de domesticación, debido a la alta similaridad entre las variedades cultivadas, adicionalmente el agrupamiento de estas variedades y dos genotipos silvestres de tépari provenientes de Sinaloa y Jalisco, indican que se puede tratar de poblaciones ancestrales de estas variedades y por lo tanto indicando también estas regiones como centros de domesticación (Muñoz *et al.* 2006).

1.1.3.Descripción de la especie

La especie *P. acutifolius* A. Gray es la menos cultivada de las especies de frijol domesticadas, y la única que se cultiva a pequeña escala en regiones donde el estrés patológico y ambiental no favorece al frijol común. Las semillas de frijol tépari son más pequeñas que cualquier variedad del frijol común, el sabor es similar y tiene gran variedad de preparaciones gastronómicas. Luego de los avances en la irrigación mecanizada de los cultivos que permitió que especies intolerantes a sequía crecieran en zonas semiáridas, el interés por el cultivo de tépari como resistente a sequía fue disminuyendo. Pero teniendo en cuenta que va aumentando la escasez del agua en muchas regiones, sirve de incentivo para la reevaluación de cultivos tolerantes a sequía (Pratt & Nabhan 1988b).

Los tépari se usan como frijoles secos. Las plantas son tolerantes a sequía, pero necesitan gran cantidad de humedad de las semillas para la germinación y en etapas tempranas de crecimiento. Si se cultiva con riego, los rendimientos se incrementan en los granos secos. En el norte de florida las semillas se plantan en septiembre y se deja madurar en noviembre antes del cambio de clima. Los mejores rendimientos son esperados en el sur de florida durante los meses de invierno, que es más corta la duración del día ya que los granos son sensibles a la duración del día (Stephens 2015).

1.1.4.Importancia del Cultivo de Frijol

Los frijoles son las más importantes leguminosas de grano para consumo directo en el mundo. El total de la producción excede los 23 millones de toneladas métricas y de los cuales 7 millones son producidos en América Latina y África. Una gran parte de la producción de frijol en América Latina, se lleva a cabo en las fincas pequeñas que van desde 1 a 10 ha de extensión, a menudo en terrenos inclinados y de baja fertilidad. Se estima que cerca del 80% del área sembrada con frijol se encuentra en ladera, y estas pequeñas propiedades se dispersan, por lo que es difícil definir la principal zona de producción. En Brasil, alrededor de un tercio del total de frijol se produce en fincas de menos de 10 hectáreas. En México, se estima que el 67% de la producción proviene de granjas más pequeñas (<5 ha). Incluso en Chile, que exporta gran parte de su producción, los granos se cultivan por algunos 50 000 agricultores cuyas parcelas varían del 2 al 6 ha y un menor número de productores de mediano tamaño que la planta

20-30 ha. A nivel regional, más de la mitad de la producción se produce en fincas menores de 20 hectáreas y más de 20% en fincas de menos de 5 ha. Los casos extremos están representados por países como Haití, Antillas menores, y Paraguay, donde la producción es casi exclusivamente en manos de las familias campesinas (Broughton *et al.* 2003).

1.1.5.Cambio climático

La definición del cambio climático según el grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC), se refiere a una alteración en el estado del clima que se puede identificar, realizando pruebas estadísticas de la variabilidad de las propiedades del clima por la extensión de periodos de tiempo como décadas o más largos, y esto es comparado con periodos de referencia, estos cambios significativos en el clima en tiempo determinado puede resultar debido a variabilidad natural o de la actividad humana (Pachauri *et al.* 2007)

Según la convención del cambio climático del marco de referencia de las Naciones Unidas, la definición se le atribuye directa o indirectamente a la actividad humana, que puede ocurrir naturalmente, pero en las últimas décadas las concentraciones de gases de origen antropogénico, han alcanzado niveles considerables en tiempos históricos. Otras actividades que contribuyen de forma significativa a la generación de gases de efecto invernadero son: la actividades de la industria agropecuaria, y el cambio de uso del suelo como la deforestación, eliminación de residuos en vertederos por la producción de cemento o procesos industriales, refrigeración, fabricación de espumas y uso de solventes. El IPCC proyecta que el cambio climático se hace visible en las variaciones reflejadas en los patrones de precipitaciones, el nivel del mar, permanencia de glaciares, temperatura del océano. Etc. Como también un incremento en la frecuencia y severidad de eventos climáticos extremos: ciclones tropicales, excesivo incremento en el nivel del mar, deterioro de los glaciares, calentamiento de los océanos. Algunos modelos predictivos sugieren un incremento de la frecuencia en la pérdida de los cultivos debido a eventos extremos, tales como la sequía y fuertes precipitaciones, que puede superar los efectos positivos del incremento moderadas en la temperatura. Estos factores pueden tener serias consecuencias para la alimentación y la producción en silvicultura que puede resultar en conflictos sobre el agua, fallas en el cultivo, hambre, enfermedades, migración de masas de personas a través de bordes. El cambio climático es una amenaza múltiple haciendo que los problemas sean más graves (Pace *et al.* 2013).

1.1.6. Mecanismos de tolerancia a sequía en plantas

Las plantas tienen un amplio rango de respuestas de acuerdo a las diferentes alteraciones asociadas a estrés por factores bióticos o abióticos, como son alteraciones en la expresión génica y el metabolismo celular, generando cambios en el crecimiento y en rendimiento del cultivo. Una respuesta puede darse directamente por el estrés como lo es la sequía, la cual induce a pérdida en la integridad de la membrana, pero la resistencia y sensibilidad varía de acuerdo a las especies y genotipos, así como también a estados del desarrollo, órgano y tipo de tejido. En los cambios que ocurren a nivel molecular de la planta como respuesta a estrés abiótico se destacan cambios en la expresión génica y señalización de la transducción celular, por lo cual han sido analizados ampliamente así como también varios factores de transcripción y moléculas de señalización, que ahora se conocen que juegan un papel importante en la homeostasis celular bajo condiciones de estrés (Buchanan *et al.* 2015).

Las plantas se ven afectadas frecuentemente por estrés hídrico y salinidad en los suelos, los cuales se observan en muchos hábitats, por eso las plantas han desarrollado varias estrategias para enfrentarse a estos retos, que puede ser mecanismos de adaptación, los cuales les permiten sobrevivir a condiciones adversas o hábitats de crecimiento específico para evitar las condiciones de estrés. Las plantas tolerantes a estrés han involucrado ciertos mecanismos adaptativos para diferentes grados de tolerancia, los cuales son determinados en gran medida por la plasticidad fenotípica. La tolerancia diferencial al estrés puede ser atribuida a diferencias en la reactividad de la planta en términos de la percepción del estrés, señales de transducción y programas apropiados de expresión de genes u otras nuevas vías metabólicas que están restringidas en las plantas tolerantes. La exposición a estrés por sequía o salinidad provoca muchas reacciones comunes en las plantas. Estos conducen a la deshidratación celular, el cual causa estrés osmótico y la remoción de agua desde el citoplasma hacia los espacios extracelulares resultando en una reducción de los volúmenes citosólicos y vacuolares. Otras consecuencias es la producción de oxígeno reactivo en las especies, lo cual afecta estructuras celulares y el metabolismo negativamente. Las respuestas tempranas al estrés por agua o salinidad son muy similares, a excepción de los componentes iónicos. Estas similitudes incluyen procesos metabólicos tales como una disminución en la fotosíntesis o procesos hormonales como los crecientes niveles de hormona vegetal ABA (ácido abscísico) (Bartels & Sunkar 2005).

La adaptación a la sequía es sin duda un proceso complejo, que implica numerosos cambios, incluyendo crecimiento atenuado, activación o aumento en la expresión de genes, aumentos transitorios en los niveles de ABA, la acumulación de solutos compatibles y proteínas

protectoras, mayores niveles de antioxidantes, supresión de energía que consume en las vías metabólicas. Sin embargo no hay un consenso sobre los procesos claves para determinar la tolerancia. Con el avance de tecnologías para el estudio genético se han identificado varios genes involucrados con estos tipos de estrés, estos estudios se han llevado a cabo principalmente en la especie *Arabidopsis thaliana*, aunque solo se conoce la función de un número limitado de productos génicos. Varios genes asociados a estrés han sido evaluados o hay estudios en curso por su contribución a la sequía o tolerancia a la sal. Tal vez se requieren estudios sobre el terreno para una posible utilización de estos genes para mejorar la tolerancia al estrés en agrícola plantas a través de enfoques biotecnológicos (Bartels & Sunkar 2005).

El desarrollo de cultivos con resistencia a sequía, requiere el conocimiento de los mecanismos fisiológicos y control genético de los rasgos que contribuyen en las diferentes etapas del desarrollo de la planta. Es imprescindible mejorar la tolerancia a la sequía de los cultivos bajo circunstancias cambiantes, todavía no existen medios tecnológicos económicamente viables para facilitar la cosecha de producción en condiciones de sequía, pero, el desarrollo de plantas tolerantes al estrés por sequía puede ser prometedor, y ayudaría en el cumplimiento de las demandas de alimentos (Farooq *et al.* 2009).

1.1.7. Marcadores genéticos

Los marcadores genéticos representan diferencias entre organismos a nivel individual o especies; y se encuentran localizados en proximidades a genes o estrechamente ligados, lo que no necesariamente implica una afección en el fenotipo de la característica de interés. Los marcadores genéticos ocupan una posición específica en el genoma, específicamente en los cromosomas, y se les denomina loci. Se conocen tres tipos de marcadores genéticos de acuerdo a procedencia de estos: los marcadores morfológicos los cuales se determinan de acuerdo a características físicas o fenotípicas, los marcadores bioquímicos, los cuales relacionan las variantes alélicas de enzimas y por último los marcadores moleculares, que indican los sitios de variación en el ADN. (Collard *et al.* 2005)

Los marcadores de ADN son los más usados, principalmente por su abundancia; estos son producto de diferentes clases de mutaciones en el ADN: mutaciones puntuales, inserciones, deleciones o errores en la replicación. Además del uso de marcadores de ADN en la construcción de mapas de ligamiento, estos tienen numerosas aplicaciones en el mejoramiento

de plantas como la evaluación del nivel de diversidad genética dentro de germoplasma e identidad de los cultivares. Los marcadores del ADN son particularmente útiles si revelan diferencias entre los individuos de la misma o diferentes especies, los cuales son llamados marcadores polimórficos y los que no discriminan genotipos son llamados monomórficos (Collard *et al.* 2005).

El polimorfismo genético es definido como la ocurrencia simultánea de una característica en la misma población de dos variantes o más discontinuas o genotipos. Los marcadores de ADN parecen ser los mejores candidatos para la evaluación eficiente y la selección de un material vegetal; estos se segregan como genes individuales y no se ven afectados por el entorno. Para la utilización de marcadores moleculares se extrae el ADN fácilmente de la planta, donde existe una amplia gama de técnicas moleculares disponibles que detectan polimorfismos a nivel del ADN, dependiendo de tipo de estudio a realizar (Kordrostami & Rahimi 2015)

Varios tipos de marcadores moleculares se utilizan para evaluar polimorfismos del ADN y se clasifican generalmente como marcadores basados en hibridación y reacción en cadena de la polimerasa (PCR); en el primer caso, se realiza la digestión de un ADN diana con enzimas de restricción; los fragmentos de restricción generados, pueden ser visualizados en geles con el objetivo de caracterizar o determinar variables alélicas; hibridaciones tipo southern blot pueden utilizarse como complemento y permiten rastrear las variante alélicas en grupos de individuos con perfiles genotípicos desconocidos. En el segundo caso las amplificaciones basadas en PCR los marcadores son implicados en la amplificación in vitro de secuencias particulares de ADN o loci, con la ayuda de oligonucleótidos o secuencias cortas de ADN elegidos específica o arbitrariamente, basándose en la capacidad para hibridar con un gen diana de interés; una enzima termo estable, la ADN polimerasa que sintetiza fragmentos de ADN ubicados en los sitios de reconocimiento de los oligonucleótidos; Los fragmentos amplificados son separados electroforéticamente y los patrones de bandas son detectados por diferentes métodos tales como la tinción y autorradiografía. Desde que la ADN polimerasa fue termo estable, el uso de marcadores basados en PCR se ha incrementado enormemente en laboratorios de investigación (Kumar *et al.* 2009).

1.1.8. Genes candidatos

Es una técnica muy usada para identificar factores de riesgo genético enfocada a desordenes complejos, los cuales prueban los efectos de las variantes genéticas de un gen que contribuye potencialmente en un estudio de asociación con una característica de interés. Estos estudios, se realizan relativamente rápidos, económicos y permiten la identificación de genes con efectos pequeños. Sin embargo, el enfoque es limitado por cuanto se conoce de la biología de la característica que está siendo investigada. Se pueden identificar regiones genéticas asociadas o enlazadas con la característica de interés por observaciones o fenotipificación. En muchos casos se puede conocer la secuencia de ADN de los genes pero no tener alguna información sobre la variación funcional del gen. La detección de las variantes genéticas involucra secuenciación de las regiones de ADN para un gen entero tanto para individuos susceptibles y resistentes y encontrar las diferencias. Estas regiones pueden ser clonadas o aisladas para promover el análisis y la caracterización de los genes responsables (Kwon & Goate 2000).

Los genes con funciones conocidas en una característica de interés pueden enriquecer el número de características asociativas, basados en el conocimiento disponible de ligamiento genético, efectos bioquímicos y/o fisiológicos de los genes candidatos en especies de plantas modelo o no. Los marcadores genéticos son genotipados en un locus que se cree están involucrados con algún fenotipo, y se somete a una prueba de asociación entre estos marcadores genéticos y el fenotipo; en plantas este enfoque ha tenido éxito para los genes candidatos de vías relativamente simples y genes candidatos con amplia evidencia previa de un papel en el fenotipo deseado. La selección de genes candidatos es relativamente sencillo para vías bioquímicas simples (por ejemplo, la síntesis de almidón en el maíz) o vías bien caracterizados (por ejemplo, tiempo de floración en *Arabidopsis*) que se han resuelto principalmente a través de análisis genético de loci mutantes (natural o inducida). Sin embargo, para los rasgos complejos tales como granos o rendimiento de la biomasa, la totalidad del genoma podría servir como candidato (Pace *et al.* 2013).

1.1.9. Genes candidatos tolerantes a sequía

Los patrones de variación nucleotídica encontrada en los genes están relacionados con la baja o alta diversidad nucleotídica involucrada, con un polimorfismo neutral o de selección purificadora que actúan sobre estos genes; cuando hay mayor diversidad puede indicar una selección adaptativa y su expansión en la población, como también un contraste entre las poblaciones silvestres y cultivadas estudiadas. Las aproximaciones obtenidas en los patrones de variación nucleotídica es el primer paso hacia un estudio de asociación entre los polimorfismos genéticos de esta familia de genes y la variación en la característica de tolerancia a sequía (Cortés *et al.* 2012).

- **Genes *Asr***

La deficiencia en el suministro de agua es uno de los principales factores abióticos limitantes de la disminución en productividad de los cultivos. Cuando las condiciones del suelo sufren desecamiento, suceden cambios en la planta a nivel celular en respuesta al estrés; se ha reconocido que la acumulación de ácido abscísico (ABA) es responsable de la expresión de varios de los genes que provoca la acumulación de diferentes productos durante periodos de déficit hídrico (Bartels & Sunkar 2005).

La hormona vegetal del ácido abscísico (ABA), participa en muchos aspectos relacionados con la respuesta al estrés como también en el desarrollo de la semilla (dormancia y germinación). Durante el crecimiento vegetativo, ABA media respuestas adaptativas críticas para la sobrevivencia de la planta durante la sequía, salinidad y estrés por frío. Estos factores de estrés sirven como activador para la acumulación de ABA, lo que a su vez activa varios genes asociados con el estrés que se cree funcionan en la acumulación de proteínas osmoprotectantes, señalización y regulación transcripcional etc. La inducción de genes se puede correlacionar con la adquisición de tolerancia a la desecación. Mutantes ABA-insensible y biosintéticas han confirmado el papel de ABA como un molécula intermediaria entre la percepción del estrés y la respuesta celular al estrés. Cuando se hace inducción del gen *uNCED1* se demostró que era un poco antes que la acumulación ABA en condiciones de sequía lo que sugiere que la regulación transcripcional de los genes implicados en la ruta de biosíntesis de ABA son responsables de la acumulación de ABA provocada por la sequía. En el caso de la transpiración a través de los poros estomatales es una respuesta crucial de la

planta bajo estrés osmótico regulado por ABA. El cierre de poros estomatales en los tejidos aéreos es un mecanismo importante por lo cual las plantas superiores regulan el balance de agua, las células “guardianas” flanquean los poros y los estomas se integran y responden apropiadamente a los cambios en los niveles de agua. Los mutantes deficientes de ABA son propensos a la marchitez y no pueden soportar condiciones de déficit hídrico, debido a que el control de los estomas no es regulado. Con estos hallazgos se dan grandes avances en la comprensión de acontecimientos celulares que subyacen a la regulación de la abertura de los estomas en respuesta al estrés osmótico (Bartels & Sunkar 2005)

Las proteínas Asr de especies diferentes al tomate están localizadas en el núcleo, donde regulan promotores específicos, esto sugiere que estas proteínas son factores de transcripción cuyo objetivo es el transporte de hexosas y como genes de respuesta del ácido abscísico (ABA). Dado que muchos genes son inducidos ellos mismos por ABA y los genes implicados en el transporte de azúcar, tiene estrecha relación entre la respuesta de las hormonas y la regulación de azúcares en la planta por estrés hídrico y de hecho los azúcares y ABA actúan de forma concertada durante los procesos de desarrollo en las plantas (Frankel *et al.* 2006).

El Asr1 de tomate fue el primer miembro reportado de la familia Asr (ABA / estrés hídrico / maduración inducida), que posteriormente llamó la atención de otros grupos en el nivel de expresión de genes. Asr1 entonces llevó cierta manera al descubrimiento de otros miembros de la misma familia. Hasta la fecha hay tres miembros estudiados de esta familia, llamados Asr1, Asr2 y Asr3; Recientemente un cuarto miembro se informó, pero todavía no se encuentra bien caracterizado (Maskin *et al.* 2001).

- **Genes DREB**

Se ha reconocido entonces que en las plantas existen mecanismos de respuesta fisiológica de tolerancia a sequía y a bajas temperaturas, involucrando el ácido abscísico que se produce bajo este tipo de estrés y juega un rol importante en la supervivencia de las plantas. La función de algunos genes que participan en dicha respuesta del estrés por sequía y genes inducibles por frío que han sido estudiados hasta la fecha son también inducidos por ABA. La deshidratación parece desencadenar la producción de ABA, que a su vez induce la expresión de varios genes. Sin embargo aunque en algunas plantas se da la expresión de varios genes ABA inducidos por la sequía o el frío, se encuentran mutantes de *Arabidopsis* que carece de genes Asr, y en otras especies puede aparecer una sola copia o aparecer diferentes miembros

de la familia de genes *Asr*. En estudios anteriores se ha analizado la región promotora del gen *rd29A* y un elemento de actuación *cis* responsable de la expresión de deshidratación inducida por el frío y se identificó la secuencia de nucleótidos, esta secuencia conservada de 9 pb, TACOCAT, denominada elemento de deshidratación sensible (DRE), es esencial para la regulación de la deshidratación en respuesta a la expresión génica. El DRE se ha demostrado funciona como un elemento que actúa en *cis* implicados en la inducción de la expresión *rd29A* por el estrés de baja temperatura y sequía. Motivos relacionados con el DRE se han reportado en regiones promotoras de los genes de frío y la sequía inducibles tales como *kin1*, *cor6.6*, y *RD17*, un motivo similar también se encontró (repetición C; TGGC CDAC) en la región promotora del *cor15a* inducible por frío. La secuencia central CCGAC fue encontrada en regiones promotoras del gen de semillas de oleaginosas inducibles al frío *BN115* y designado a la baja temperatura. Estos resultados sugieren que motivos relacionados con el DRE están involucrados tanto en la sequía como al frío pero en la expresión de genes ABA-independientes. Se han clonado ADNc que codifica para diferentes proteínas de unión DRE (*DREB1A* y *DREB2A*) de *Arabidopsis* que interactúa específicamente con la secuencia DRE en la región promotora del gen *rd29A*.

Los genes que codifican la proteína *DREB1A* y sus dos homólogos se indujeron para expresar estrés por frío; los genes que codifican la proteína *DREB2A* y su único homólogo rápidamente fueron inducidos para expresar la deshidratación y la tensión alta en sal. Tanto el *DREB1A* y homólogos *DREB2A* contienen el dominio EREBP / unión al ADN AP2 como la de *CBF1*. Se analizó la función de las proteínas *DREB1A* y *DREB2A* como factores que actúan mediante el uso transitorio de expresión en protoplastos de la hoja en *Arabidopsis* y la sobreexpresión en plantas transgénicas de *Arabidopsis*. Se han discutido las diferentes funciones de la *DREB1A* y proteínas *DREB2A* en la separación de dos vías de señalización para condiciones de estrés al frío y la deshidratación en la expresión génica ABA-independiente de los tejidos vegetativos (Liu *et al.* 1998).

- **Genes *ERECTA***

Los genes *ERECTA* funcionan como reguladores de transcripción y son de los genes mejor caracterizados relacionados con la tolerancia a la sequía. Se caracterizaron en *Arabidopsis thaliana* y están implicados en la percepción del estrés por sequía a través de señales de la membrana celular, donde las proteínas de *ERECTA* están localizadas. Estos genes pueden responder a patógenos regulares, y están involucrados en un número indeterminado de células

epidérmicas. Las proteínas codificadas por los genes ERECTA también determinan la frecuencia y el desarrollo de los estomas en las hojas, que determinan el control de la evapotranspiración. Por lo tanto, los genes ERECTA ejercen una fuerte influencia en la transpiración total de la planta. Las proteínas ERECTA (abreviados como proteínas ER) pertenecen a la superfamilia quinasa pro-proteína y a la familia de la proteína quinasa Ser / Thr, que contienen proteínas que están asociadas con procesos biológicos, incluyendo el desarrollo y la defensa a patógenos. ER también se caracterizan por un dominio con 20 repeticiones ricas en leucina (LRR) extra-celulares y en el otro extremo por un dominio intra-celular proteinquinasa. Las proteínas ER parecen ser específicos en el número de repeticiones LRR e incluyen tanto las codificadas por los genes en sí de ERECTA, junto con las codificadas por los genes similares a ERECTA (ERL1 y ERL2 en *Arabidopsis* y muchas otras dicotiledóneas). Los mecanismos de la familia ERECTA tienen un efecto sobre el desarrollo de los estomas y la arquitectura de la inflorescencia que involucra el receptor ligando del factor epidérmico con proteínas patrón (EPF) moduladas también por proteínas. (Las proteínas ERECTA son importantes para la regulación de la canalización) (Mantenimiento de fenotipo a pesar de entorno variable) en muchos aspectos del desarrollo de órganos y de la fisiología vegetal. Por ejemplo proteínas ER y ERL afectan varias partes de la morfología de la planta, incluyendo la dependencia a la luz, el patrón de hojas en las ramas lo cual influencia el tiempo de floración y la tolerancia a la sequía. Las proteínas ERECTA funcionan como amplificadores ecológicos de transducción de la variación ambiental en la diferenciación fenotípica que tienen, como la sequía o de proteínas interactuantes y transformar éstos en cambios morfológicos en las plantas. (Blair *et al.* 2016).

1.2. Metodología

1.2.1. Población de estudio

Se evaluaron 55 accesiones de la colección de frijol tepari, provenientes del banco de germoplasma del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Este grupo abarcó 3 especies: *Phaseolus acutifolius* (6 accesiones de cultivados, 23 accesiones de silvestres) *Phaseolus parvifolius* y *Phaseolus vulgaris*. La selección de estos genotipos se realizó de acuerdo con estudios previos realizados en la colección empleado marcadores moleculares AFLP y SSR, donde los individuos más polimórficos fueron seleccionados para el análisis (Muñoz et al 2006, Blair et al 2012). Como controles positivos se incluyeron 4 genotipos de frijol común Bat 93, Bat 477, Bat 881 y el genotipo G19833, para los cuales se evaluaron los genes candidatos tolerantes a sequía en anteriores trabajos (A. Cortés et al. 2012)(Blair et al. 2016)(J. Cortés et al. 2012)

Extracción de ADN y amplificación de los genes candidatos de tolerancia a sequía

La extracción de ADN se llevó a cabo en la colección completa de frijol *Phaseolus acutifolius* la cual comprende 338 genotipos. Inicialmente se seleccionaron 2 semillas por genotipo, se esterilizaron en hipoclorito al 2% y alcohol 70%, para realizar la germinación en contenedores con arena, 15 días después de la siembra se realizó la colecta del tejido foliar en nitrógeno líquido y se almacenó en ultra-congeladores a -80°C. Después de macerar las muestras en nitrógeno líquido se procedió a realizar la extracción de ADN siguiendo el protocolo propuesto por (Dellaporta 1994), el material genético fue visualizado en gel agarosa al 1% y cuantificado en espectrofotómetro *Colobri Titertek Berthold®*. Todas las muestras de ADN fueron normalizadas a una concentración de 30ng/μl para los procesos de amplificación de los genes candidatos a tolerantes a sequía.

Para la reacción de PCR se evaluaron 3 pares de cebadores *ASR2*, *DREB2B* y *ERECTA* (Tabla 1) Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50μl de coctel mezclando 4μl de ADN 30ng/μl; 5μl de Buffer de PCR 10X (NH₄)₂SO₄; 4μl MgCl₂ 25mM; 2μl dNTP's 20mM; 0.8μl cebador F 10mM; 0.8μl cebador R 10mM; 1μl BSA 5X; 2μl Trehalosa 10%; 0,32μl Taq DNA polimerasa 5U/μl; y 30μl agua ultra pura. Estas condiciones de coctel se aplicaron a cada uno de los tres genes evaluados (Tabla 1). El perfil térmico para la amplificación comprendió:

94°C x 5min, posteriormente un ciclo a 94°C x 1 min, 62°C x 45 seg, 72°C x 1min, seguido de 30 ciclos 94°C 1min, 60°C 45 seg, 72°C x 1 min, y una extensión final de 72°C x 10 min. Estas condiciones descritas fueron empleadas para amplificar el gen ASR, respecto a DREB2B y ERECTA las condiciones de amplificación fueron las mismas a excepción de la temperatura de alineamiento las cuales fueron 52°C para DREB2B y 60°C para ERECTA respectivamente. Los productos de PCR amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5%, La electroforesis de gel agarosa se realizó en solución TBE 0.5X durante 60 min a 100 voltios, la tinción del gel fue realizada con el intercalante GelRed®, y luego la visualización en un transiluminador de luz ultravioleta.

Tabla 1. Cebadores Utilizados para la Amplificación de los Genes

Gen	F/R	Secuencia (5'-3')	Ta (C°)	Fuente
Asr2	F	CCACCACCACAAAGAGGA	60	IRD
	R	CAAACATTCTTCAAACCTTGCTCAGA		IRD
Dreb2B	F	TCTCCTTCAGCTATGAGTCC	52	CIAT/LCGF
	R	AGAGGGGAGAGGCTTGTAG		CIRAD-UMR
PvER E15	F	AATAACAATCTCGAAGGAACA	60	CIRAD-UMR
PvER E20	R	CAGATAGTTGATTATTTGAAAG		CIRAD-UMR

1.2.2. Secuenciación de ADN y análisis genéticos

La secuenciación de ADN se llevó a cabo en ambos sentidos (*Forward* y *Reverse*) usando los mismos cebadores empleados para la amplificación de cada gen. Para este proceso los productos de PCR fueron purificados siguiendo el protocolo para purificación propuesto por (Schmitz & Riesner 2006), posteriormente los productos purificados fueron evaluados en gel agarosa al 2% bajo tinción con el intercalante de ADN *GelRed*® para verificar la calidad y concentración de los productos purificados.

Los datos de secuencias crudas fueron analizados y editados manualmente en un programa para análisis genéticos *Geneious R10* (Kearse *et al.* 2012). La generación de *Contigs* se realizó con la secuencia *Forward* y *Reverse* para cada muestra y a partir de la secuencia consenso se identificó el sitio de anclaje de los cebadores para cada gen secuenciado con el fin de identificar variaciones en longitud de las secuencias obtenidas para cada especie. Para el

alineamiento múltiple de secuencias se utilizó el programa *Bioedit*® v 7.1.11 (Hall 1999), a partir de esta matriz de datos se realizaron los análisis genéticos para los 3 genes secuenciados.

La identificación de haplotipos comprendió en análisis de todo el grupo de muestras separadas por especies en una sola corrida usando el programa *DNAsp* v. 5 (Rozas & Rozas 1995) generando la identificación de haplotipos presentes en cada especie y los puntos mutacionales dentro de la secuencia. Variables como diversidad nucleotídica y haplotípica fueron ejecutadas en este programa. La red de haplotipos, realizada en el programa *Network* 5.0.01 (Fluxus-engineering 2015) se construyó considerando todos los sitios de cada secuencia (nucleótidos y Gaps) y con un valor de análisis 3 veces mayor a las Transversiones respecto a las Transiciones debido a que son menos probables que ocurran. Siguiendo estos parámetros y aplicando el algoritmo Median-Joining (MJ) los nodos se formaron de acuerdo a los haplotipos compartidos, unidos por ramas que indican que haplotipos son más cercanos (menos pasos mutacionales) y los mas distantes.

Para los análisis de disimilaridad en el programa *GenAlex* v. 6.5 (Peakall & Smouse 2012) se identificó la distancia genética entre especies y entre individuos para cada uno de los tres genes, adicionalmente un Análisis de Coordenadas Principales se construyó para cada gen. Con este análisis se pudo identificar las distancia genéticas entre individuos y poblaciones en un diagrama de 2 dimensiones, sin embargo para obtener una mejor perspectiva de las agrupaciones, se realizó un diagrama de tres dimensiones ejecutado en el programa *XLSTAT*® (Addinsoft 1993) para una mejor interpretación de los resultados. Adicionalmente el programa *Darwin*® v. 6.0.014 (Perrier *et al.* 2003) por medio del algoritmo Neighbor-Joining se identificó la cercanía de las muestras a partir de la información nucleotídica que las compone generando un árbol cuya topología no presenta raíz, sin embargo por medio de la identificación de las diferencias de nucleótidos y bajo un Bootstrap de 3000 replicas se generó el árbol mas parsimonioso a priori para identificar las agrupaciones generadas en este análisis.

Para las inferencias filogenéticas el programa *Mega* 7.0 (Tamura *et al.* 2007) fue empleado bajo el método de Máxima Verosimilitud aplicando un Bootstrap de 1000 replicas basado en el modelo heurístico de Kimura de 2 parámetros considerando el árbol más parsimonioso para el árbol inicial. Éste modelo fue aplicado en la evaluación de cada uno de los genes por separado e identificar el grado de variación entre las especies y los genes.

1.2.3. Ubicación de los genes candidatos de tolerancia a sequía en el genoma de referencia

Para la identificación de la composición de los genes secuenciados (exones e intrones) se procedió inicialmente a realizar una comparación en la base de datos del NCBI usando el usando el algoritmo BLAST. A partir de esta búsqueda se pudo identificar la secuencia del ARN mensajero reportada para estos genes en frijol común. Sin embargo fue necesario identificar la posición física de los genes en el genoma de frijol e identificar cuantos exones e intrones estaban presentes en las secuencias obtenidas en el presente estudio. Empleando el genoma referencia para frijol común genotipo G19833 publicado por (Schmutz *et al.* 2014) se pudo identificar la posición exacta, en pares de bases, de cada gen respecto al cromosoma que lo contiene, además se identificaron los intrones y exones del cada gen completo y la cobertura de cada uno de los fragmentos de los genes secuenciados en este estudio, de esta forma se pudo realizar análisis comparativos de composición nucleotídica comprendiendo solo los exones para frijol común (Bat 93, Bat 477, Bat 881 y G19833), frijol tepari (cultivados, silvestres y var. tenuifolius), *P. parvifolius* y genoma de referencia G19833. Una vez se realizó la identificación de los exones, se realizaron anotaciones génicas en el programa Geneious® R10 para reconocer los intrones y exones, siendo estos últimos ensamblados y alineados respecto al genoma de referencia y traducidos a secuencias de amino ácidos para identificar los eventos de nucleótidos polimórficos (SNP) y los posibles cambios sinónimos y no sinónimos de los genes entre y dentro de las especies.

2. Capítulo 2

Resultados y Discusión

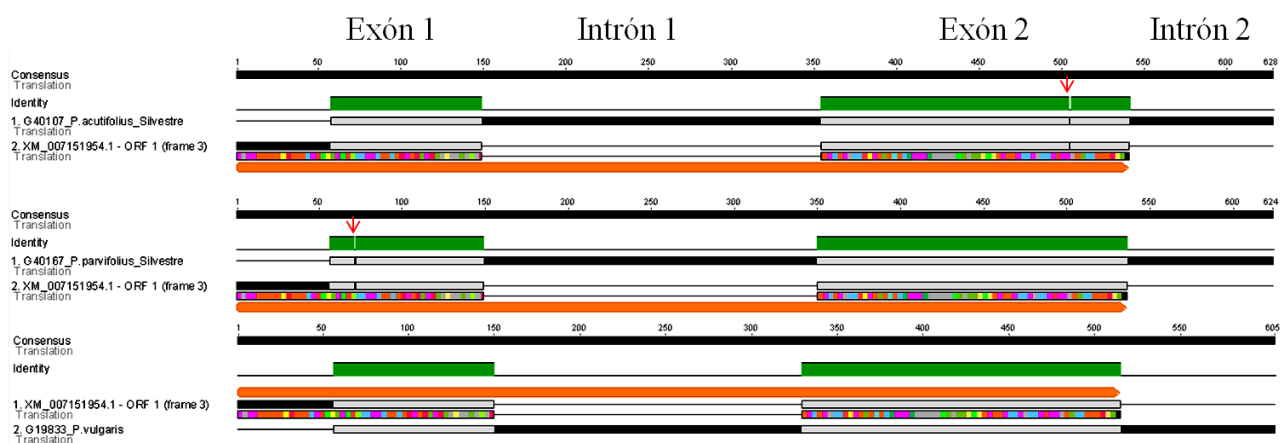
2.1. Resultados

2.1.1. Gen ASR2

Evaluación del Gen candidato tolerante a sequía ASR2 (Ácido abscísico, estrés, maduración inducida) de la familia de genes planta-específicos componentes reguladores de estrés dependiente de la vía ABA (Ácido abscísico), en 55 accesiones de la colección de frijol tépari del CIAT (Palmira - Colombia).

La región secuenciada del gen ASR2 tuvo 630pb de los cuales abarca parte del exón 1 en el nucleótido número 58 y el aminoácido 20, con un tamaño de 92pb, luego el intrón 1 de 205pb, donde comienza el exón 2 con 186pb y 62 aminoácidos y por último el intrón 2 con 89pb. En la figura 1 se observa el alineamiento de *P.acutifolius* (silvestre), *P. parvifolius* y el genotipo G19833 de *P. vulgaris* con la secuencia de referencia del RNAm de *P.vulgaris* obtenida del NCBI, se encontraron cambios mutacionales en las secuencias de *Phaseolus acutifolius silvestre* en el segundo exón y en la especie *P. parvifolius* en el primer exón con respecto a la referencia; en el caso de *P. vulgaris* genotipo G19833, la cual también fue secuenciada en este estudio y fue tomado como control positivo, que al comparar se obtuvo total coincidencia.

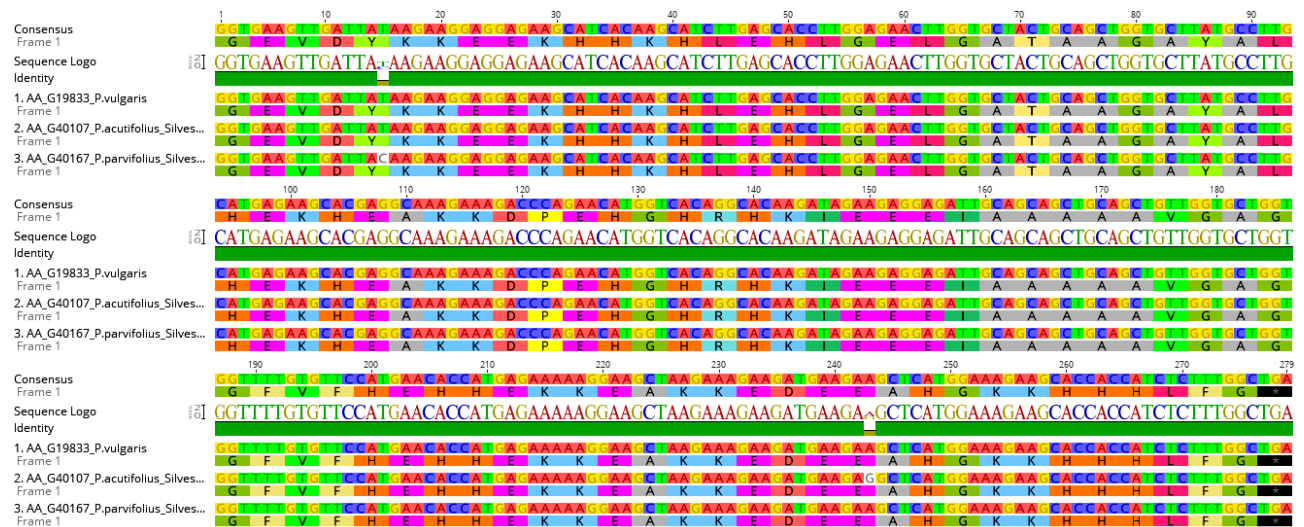
Figura 1. Alineamiento de región completa del gen ASR2 en las especies estudiadas.



Alineamiento de *P. acutifolius silvestre*, *P. parvifolius* y el genotipo G19833 de *P. vulgaris*, con la secuencia de referencia obtenida del NCBI: XM_007151954.1 RNAm de *P.vulgaris*.

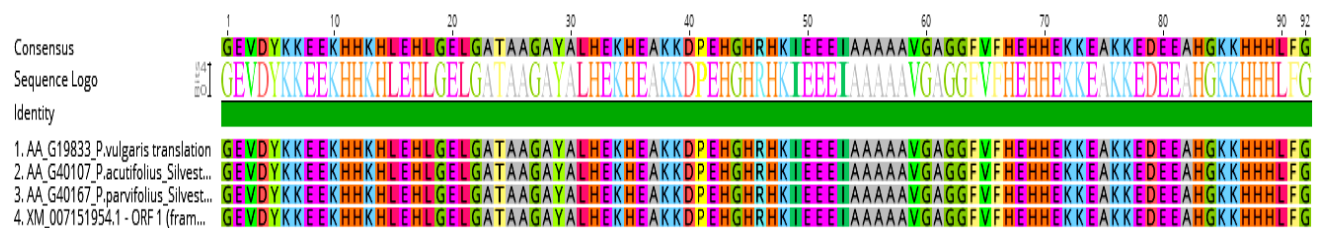
Para realizar los análisis de las secuencias se eliminaron los intrones y solo fueron considerados los exones, por lo que la región obtenida fue de 279 pb y 93 aminoácidos. En la figura 2 se muestra la región obtenida para nucleótidos y en la figura 3 la región traducida en aminoácidos. En el alineamiento de las secuencias los cambios mutacionales observados anteriormente, fueron sinónimos, detectándose en la traducción en aminoácidos donde ninguno de los aminoácidos cambia con respecto a la referencia.

Figura 2. Alineamiento de la región codificante: exón 1 y exón 2 en todas las especies



Alineamiento de la región codificante: exón 1 y exón 2 de *P. acutifolius* (*silvestre*) *P. parvifolius* y el genotipo G19833 de *P. vulgaris*, con respecto a la región codificante de la referencia del NCBI, el RNAm XM_007151954.1 en *P. vulgaris*, para el gen ASR2.

Figura 3. Alineamiento de la región codificante de aminoácidos exón 1 y exón 2



Alineamiento de la región codificante de aminoácidos exón 1 y exón 2 de *P. acutifolius silvestre*, *P. parvifolius* y el genotipo G19833 de *P. vulgaris*. Traducido a aminoácidos.

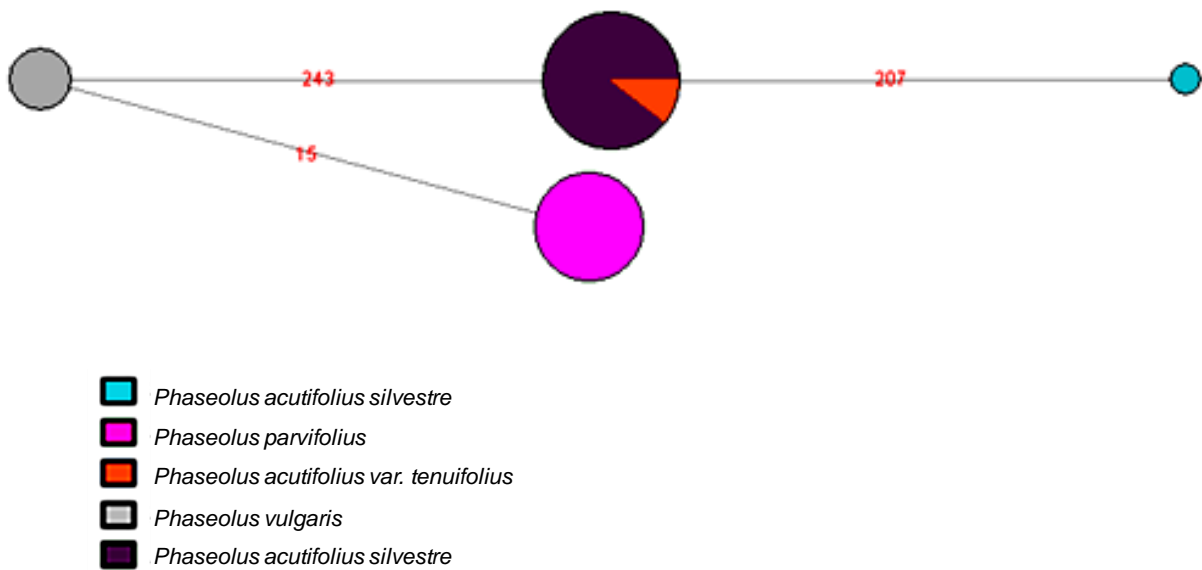
- **Determinación de la diversidad haplotípica**

La diversidad haplotípica se determinó en 36 secuencias después de ser alineadas en el programa Bioedit (Hall 1999) donde se obtuvo 280 sitios, excluyéndose sitios con gaps. Se obtuvieron 4 haplotipos con una diversidad haplotípica de 0.6143 donde el haplotipo más frecuente fue el haplotipo 2 con 19 muestras y luego el haplotipo 4 con 12 muestras. En el haplotipo 1 solo se encontraron las muestras de *P. vulgaris*, el índice de *f_{st}* (fijación en la población) fue de 0.97561, con un número de sitios polimórficos de 3 y monomórficos de 275. Las muestras fueron agrupadas de acuerdo a la especie y se determinó la diversidad haplotípica entre estos grupos con se muestra en el tabla 1. Con el programa Network se gráfican los haplotipos encontrados para el gen *ASR2*, y se determinaron para cada haplotipo las regiones geográficas involucradas por cada muestra **Figura 4 y 5**.

Tabla 2. Diversidad Haplotípica determinada por grupos de especies

No.	Población	No. de secuencia s	No. de sitios segregantes	No. De Haplotipos	Diversidad Haplotípica	Diversidad Nucleotídica
1	<i>P. vulgaris</i>	4	0	1	0.00	0.00
2	<i>P. acutifolius</i>	20	1	2	0.10	0.00036
3	<i>P. parvifolius</i>	12	0	1	0.00	0.00

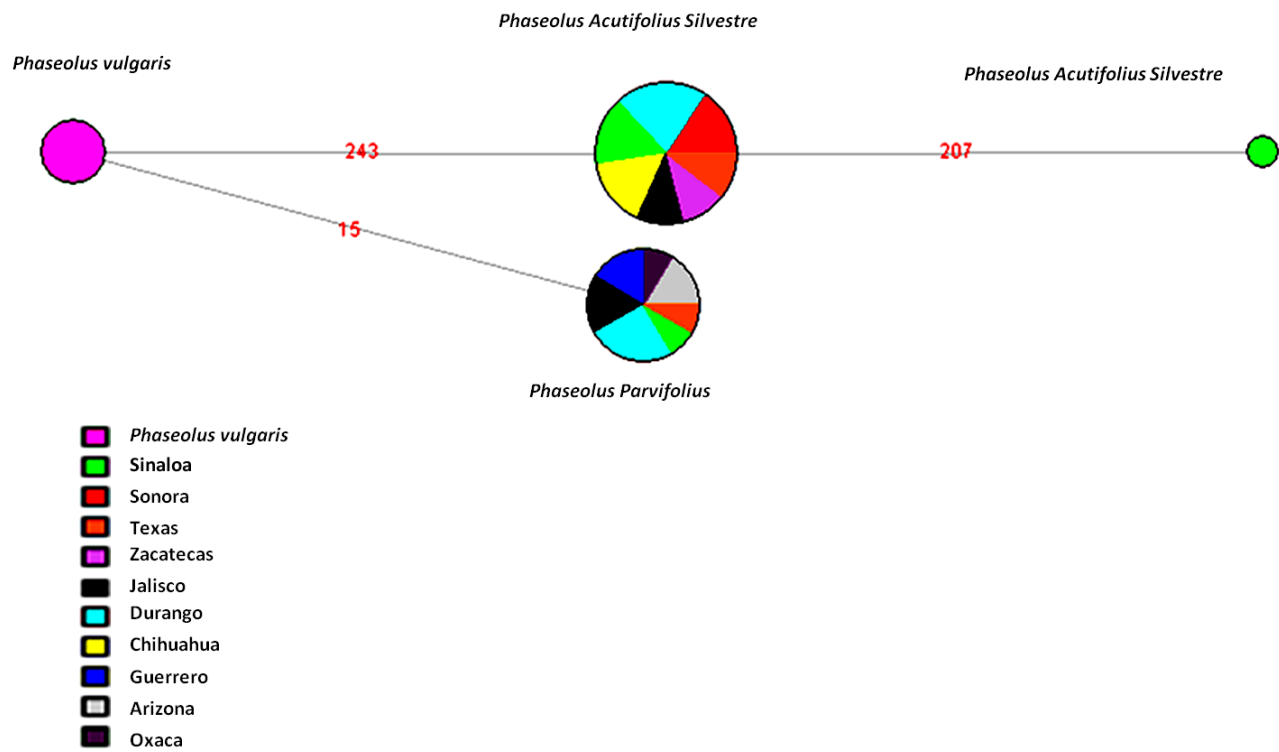
Figura 4. Red Haplótica para el gen ASR2 con las especies involucradas en cada haplotipo.



En la figura 4 se ilustra la diversidad haplotípica encontrada para el gen ASR2 donde el tamaño de las esferas indica la cantidad de muestras encontradas para cada haplotipo. Los números en rojo indican la posición del nucleótido donde ocurre el cambio mutacional desde cada genotipo, tomando como referencia la especie *P. vulgaris* ya que este no presenta variación con respecto a la referencia del RNAm de *P. vulgaris* obtenida del NCBI. La figura 5

indica la cantidad de haplotipos encontrados relacionando la procedencia geográfica de las muestras.

Figura 5. Red Haplótica considerando la región geográfica para las muestras



- **Composición nucleotídica y aminoacídica**

Al comparar la composición nucleotídica en las muestras evaluadas se observó una mayor variación en los individuos de *P. acutifolius silvestre*, donde hay cuatro individuos con composición diferente, en los individuos de *P. vulgaris*, no hubo cambios en la composición nucleotídica ni tampoco entre los individuos de *P. parvifolius* **Tabla 2.**

A pesar de evidenciarse cambios en la composición nucleotídica; estos se consideran nulos al no afectar la funcionalidad del gen entre las diferentes especies.

Tabla 3. Comparación de la Composición Nucleotídica entre las especies de Phaseolus. Porcentaje de Timina (T), Citosina (C) Adenina (A), Guanina (G). Número total de nucleótidos.

Especie	T %	C%	A%	G%	TOTAL
1. <i>P. vulgaris</i>	20.1	17.9	33.0	29.0	279
2. <i>P. acutifolius</i>	20.1	17.9	32.6	29.4	279
3. <i>P. acutifolius</i>	19.7	18.3	33.0	29.0	279
4. <i>P. acutifolius</i>	20.1	17.6	33.0	29.4	279
5. <i>P. acutifolius</i>	19.9	17.8	32.6	29.7	279
6. <i>P. acutifolius</i> var. <i>Tenuifolius</i>	20.1	17.9	32.6	29.4	279
7. <i>P. parvifolius</i>	19.7	18.3	33.0	29.0	279

La composición nucleotídica en la especie *P. vulgaris* fue la misma en todos los individuos por lo tanto se muestra solo un representante; para el caso de *P. acutifolius* se encontraron tres individuos con diferente composición nucleotídica, los cuales presentaron la misma proporción, para el caso de *P. acutifolius* var. *tenuifolius* presentó la misma composición nucleotídica que el número 2. Y todos los individuos de *P. parvifolius* presentaron la misma composición nucleotídica.

En cuanto a la composición de aminoácidos no hubo variaciones y se hizo una comparación entre especies.

Tabla 4. Distancias entre grupos por composición aminoacídica.

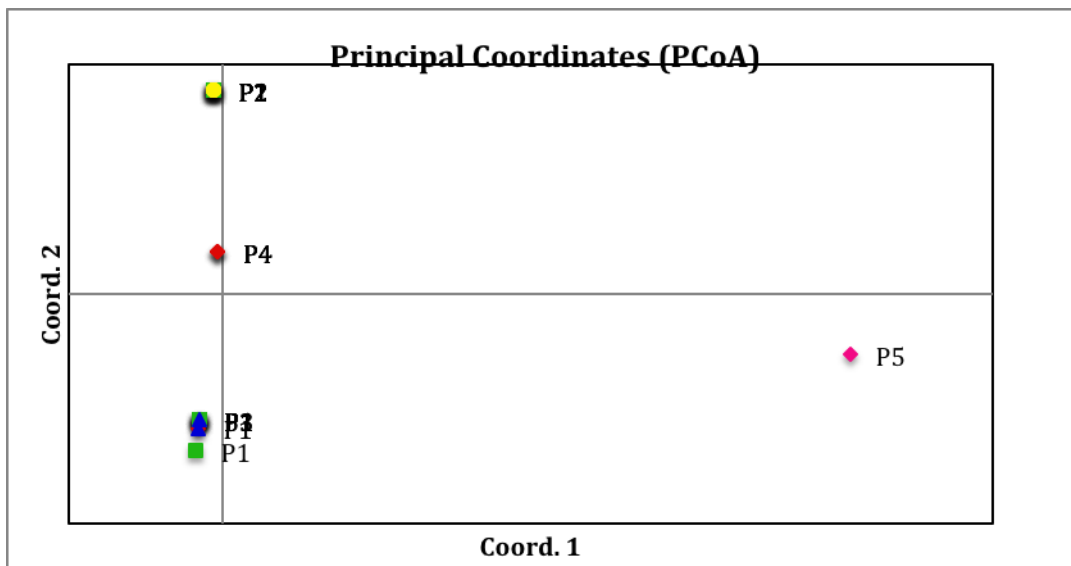
Especie 1	Especie 2	Distancia Genética	Error Estándar
<i>P. vulgaris</i>	<i>P. acutifolius</i>	0.001	0.001
<i>P. vulgaris</i>	<i>P. parvifolius</i>	0.000	0.000
<i>P. acutifolius</i>	<i>P. parvifolius</i>	0.001	0.001
<i>P. vulgaris</i>	<i>P. acutifolius</i> var. <i>tenuifolius</i>	0.000	0.000
<i>P. acutifolius</i>	<i>P. acutifolius</i> var. <i>tenuifolius</i>	0.001	0.001

La composición aminoacídica no presentó diferencias significativas a pesar de los cambios nucleotídicos presentados.

- **Análisis de Coordenadas Principales**

En el análisis de componentes principales explica cómo los individuos están relacionados entre sí en el espacio, considerándose 3 ejes, donde el eje 1 explicó el 54.33%, el eje 2 explicó el 86.33% y el eje 3 explicó el 92.37% de los datos, y se observa la distribución por población y como se encuentran relacionados en dos dimensiones **Figura 6**. Las poblaciones P1, P2, P3, P4 tienen poca variabilidad ya que están agrupadas hacia el mismo eje. En la Figura 6, se observa el índice de distancia genética de Nei, el cual estima el número de cambios mutacionales que a nivel de nucleótido se han acumulado **Tabla 4**. Los valores calculados para las poblaciones de estudio son muy bajos por lo que indican que la distancia genética es también muy poca, encontrándose que las poblaciones más distantes son la P3 y P4 (*P. acutifolius* var. *tenuifolius* y *P. vulgaris*) con un valor de 0.008 y el valor siguiente en diferencia es entre la P1 y P4 (*P. acutifolius* var. *acutifolius* y *P. vulgaris*) con un valor de 0.004.

Figura 6. Análisis de Coordenadas Principales



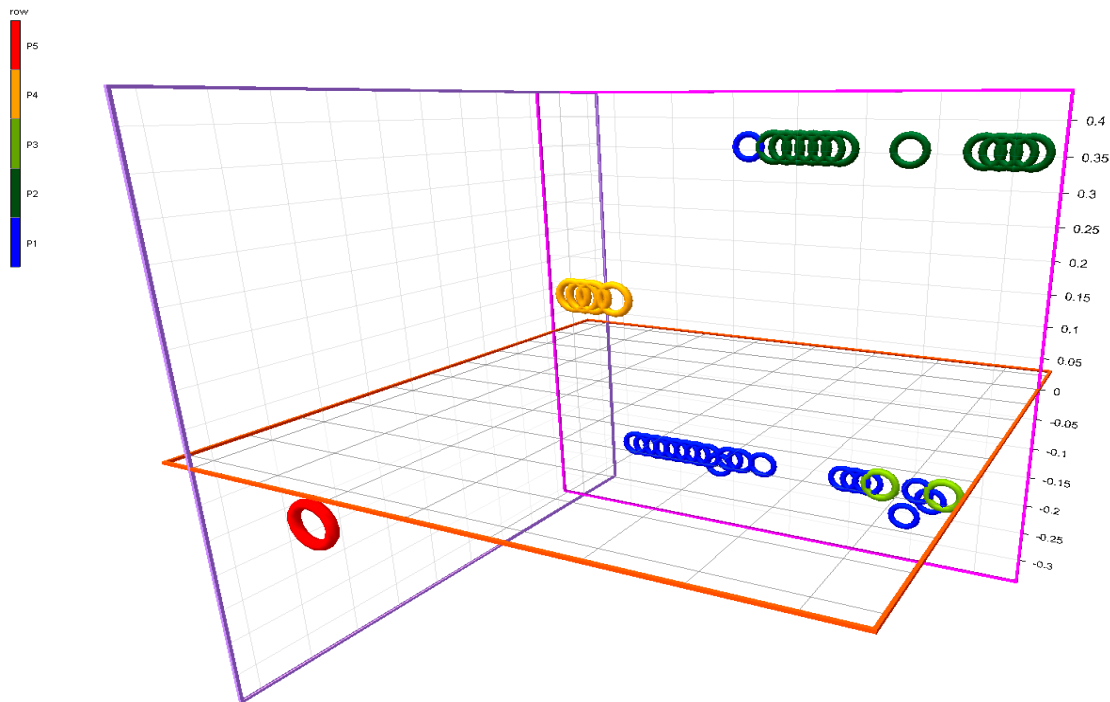
Observación en dos coordenadas de la variabilidad entre las poblaciones, donde la P1 corresponde a *P. acutifolius*, la P2 es *P. parvifolius*, P3 *P. acutifolius* var. *tenuifolius*, P4 *P. vulgaris* y P5 *Cajanus cajan* (grupo externo).

Tabla 5. Distancia Genética de Nei entre las poblaciones de *Phaseolus*

P1	P2	P3	P4	P5	
0.000					P1
0.001	0.000				P2
0.001	0.003	0.000			P3
0.004	0.002	0.008	0.000	0.000	P4
0.099	0.100	0.102	0.101	0.000	P5

En la figura 7 se puede observar la diferenciación entre los individuos de las especies de *Phaseolus* en una gráfica en tres dimensiones.

Figura 7. Gráfica en 3 dimensiones de la diferenciación genética entre los individuos de *Phaseolus* para el gen ASR2.

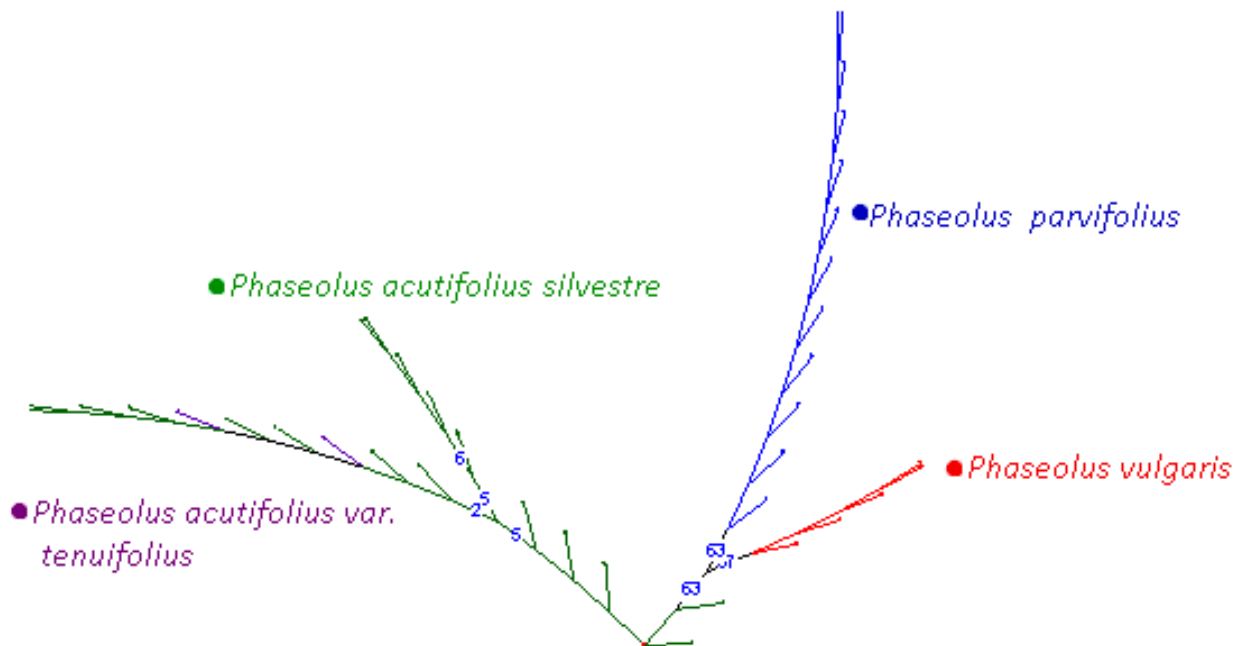


Gráfica en 3 dimensiones de la diferenciación genética entre los individuos de *Phaseolus*. P1 (*P. acutifolius silvestre*) color azul, P2 (*P. parvifolius*) verde oscuro, P3 (*P. acutifolius var tenuifolius*) color verde claro, P4 (*P. vulgaris*) color amarillo y P5 (*Cajanus cajan* o grupo externo) color rojo.

- **Análisis de Diversidad Neighbor-Joining**

Se calcularon las distancias genéticas entre especies mediante la construcción de un árbol Neighbor-Joining utilizando el software Darwin versión 5.0 (Figura 8), el cual compara las especies que presentan mayor relación y los agrupan de acuerdo a las diferencias que hay entre ellos **Figura 8**. Los números que se observan en las raíces de los nodos hacen referencia al bootstrap o soporte del agrupamiento, cuando el número estaba por debajo de 70 no fue tomado en cuenta. En el análisis se observan diferencias entre cada grupo de especies; en cuanto a *P. acutifolius var tenuifolius* no tiene separación con *P. acutifolius silvestre*.

Figura 8. Análisis de Diversidad Neighbor-Joining

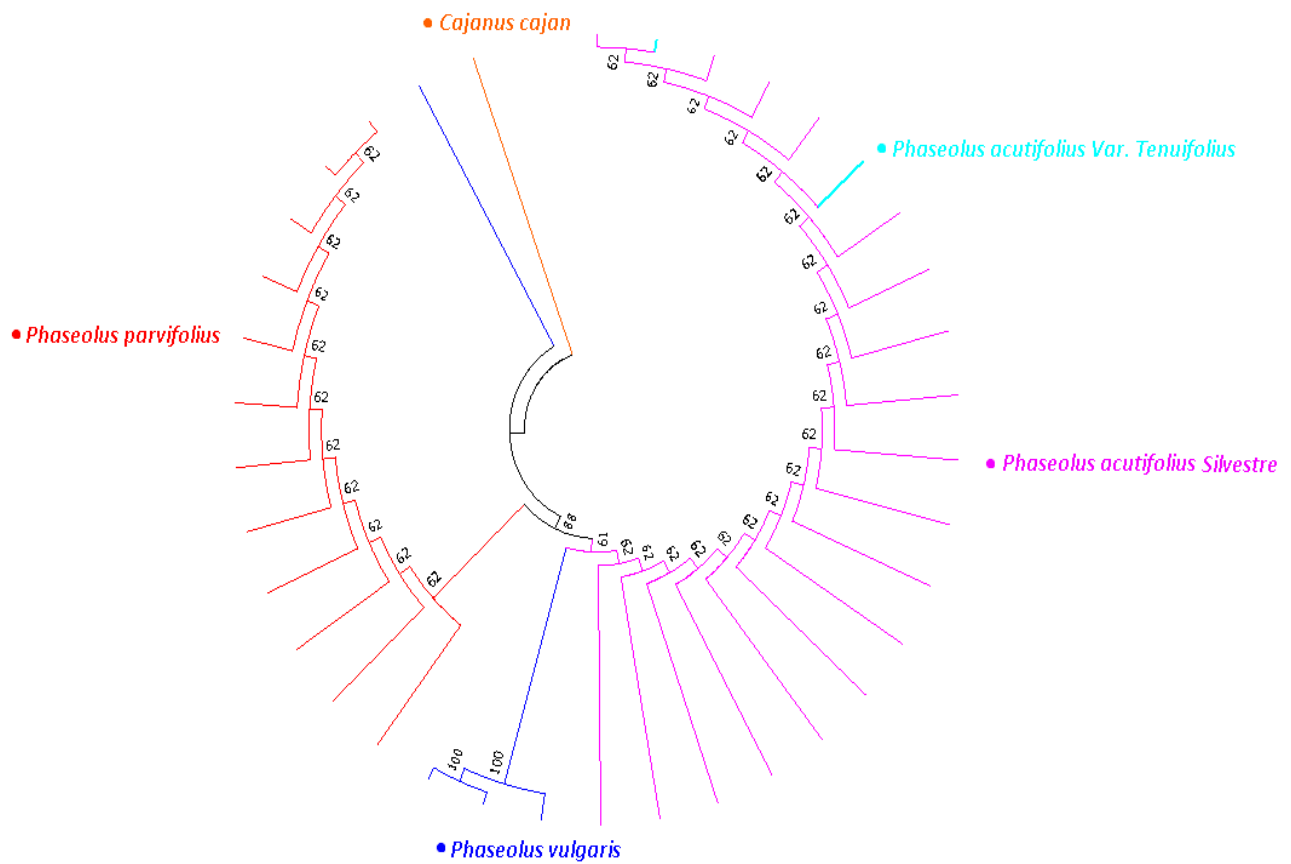


- **Análisis de Máxima Verosimilitud**

Este análisis pretendió explicar la relación entre individuos pertenecientes a tres especies diferentes del género *Phaseolus*, teniendo en cuenta un modelo evolutivo basado en tasas de cambios mutacionales. En la figura 9 se puede apreciar como los diferentes individuos de *P. parvifolius*, *P. acutifolius silvestre* y la variedad *tenuifolius* se agrupan correspondientemente con los miembros de la misma especie, corroborando la información obtenida previamente,

donde se indica que no existen diferencias significativas en el gen ASR2 entre los individuos de una misma especie; no obstante, en *P. vulgaris* se encontró un individuo distante de este grupo y de todos los demás.

Figura 9. Análisis de Máxima Verosimilitud de tres especies de *Phaseolus*



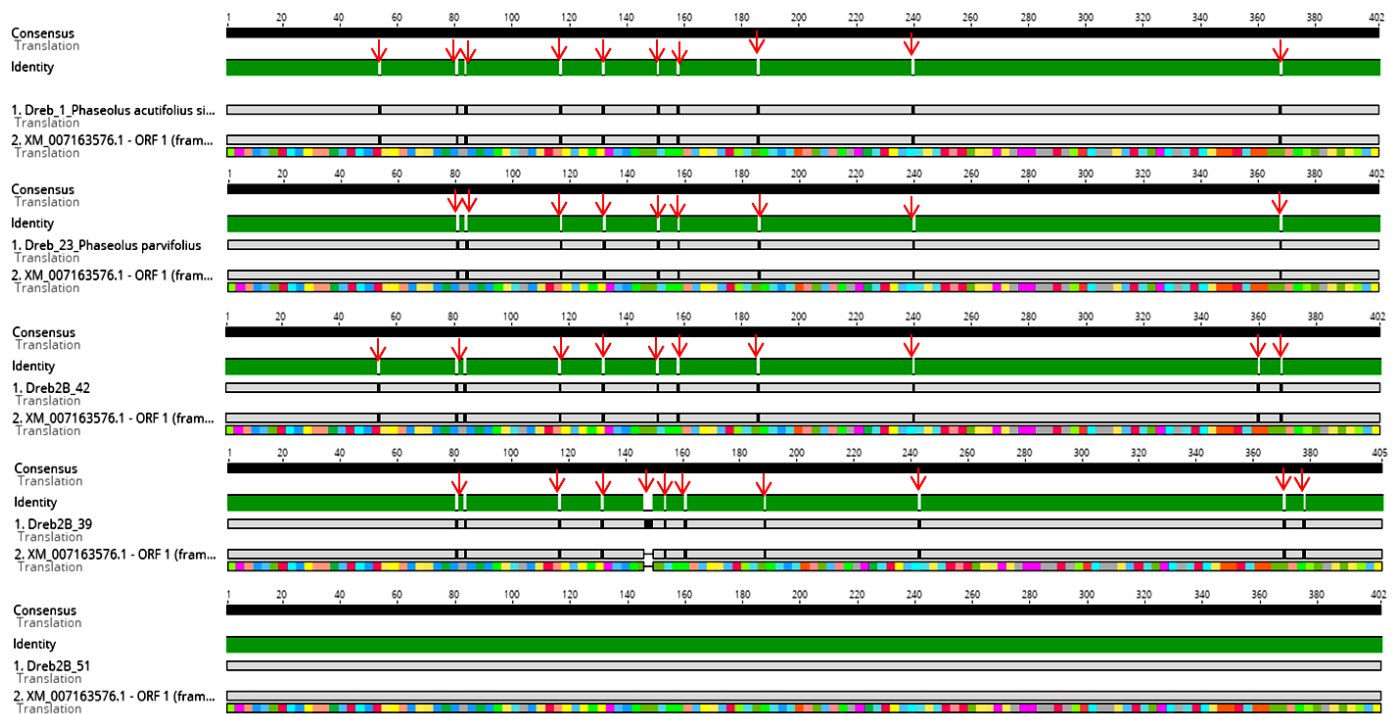
El análisis muestra la agrupación en 3 grupos definidos, con alta similitud entre *P. acutifolius* var *tenuifolius* y *P. acutifolius* var *acutifolius*, las cuales son genotipos de tipo silvestre en la especie. En los nodos se observan los valores del Bootstrap por encima del 50%.

2.1.2. Gen *Dreb2B*

Evaluación del gen candidato tolerante a sequía *Dreb2B* (Drought-responsive element binding) elemento de unión de respuesta a sequía. En 55 individuos de la colección de frijol tépari del CIAT (Palmira - Colombia).

La región secuenciada del gen *Dreb2B* tuvo 402bp de los cuales abarca parte de la región codificante que tiene 888pb, y que hacen parte de un RNAm de 1269pb, reportado por (Schmutz *et al.* 2014). Este gen no tiene intrones por lo que el gen completo es región codificante. Se pueden observar cambios mutacionales en las diferentes especies: *P.acutifolius silvestre*, 10 individuos de *P. parvifolius* y un individuo de *P.acutifolius var tenuifolius* por lo que algunos tienen una región de 405pb.Figura 10.

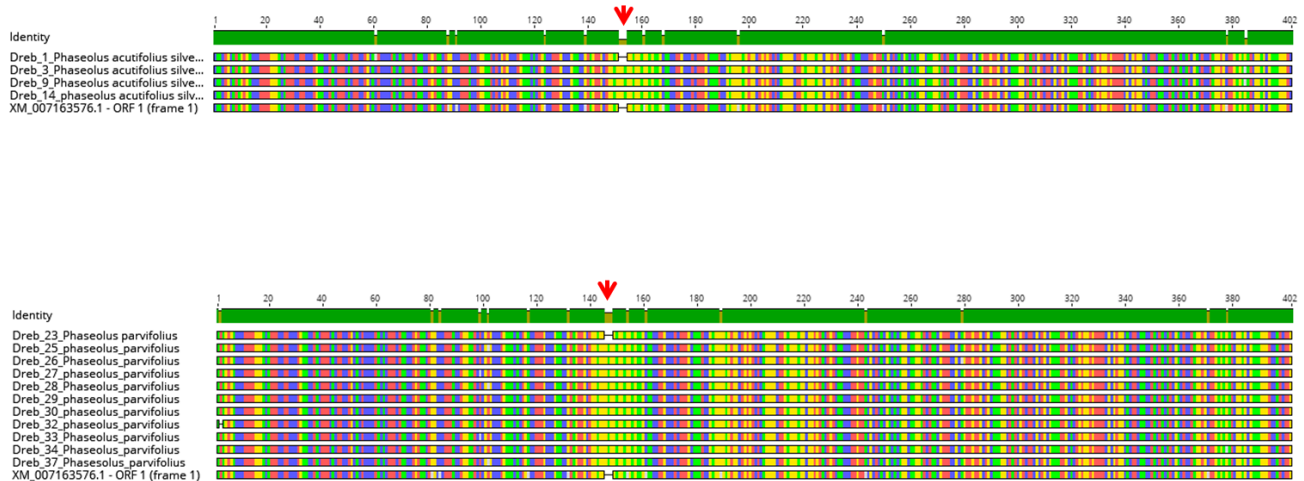
Figura 10. Alineamiento de las especies de *Phaseolus* con la secuencia de referencia



Alineamiento de *P. acutifolius silvestre* (Dreb_1), *P. parvifolius* (Dreb_23), *P. acutifolius cultivado* (Dreb_42), *Phaseolus acutifolius var tenuifolius* (Dreb_39), *P. vulgaris* (Dreb_51) y una secuencia de referencia obtenida del NCBI de RNAm de *P. vulgaris* (XM_007163576.1).

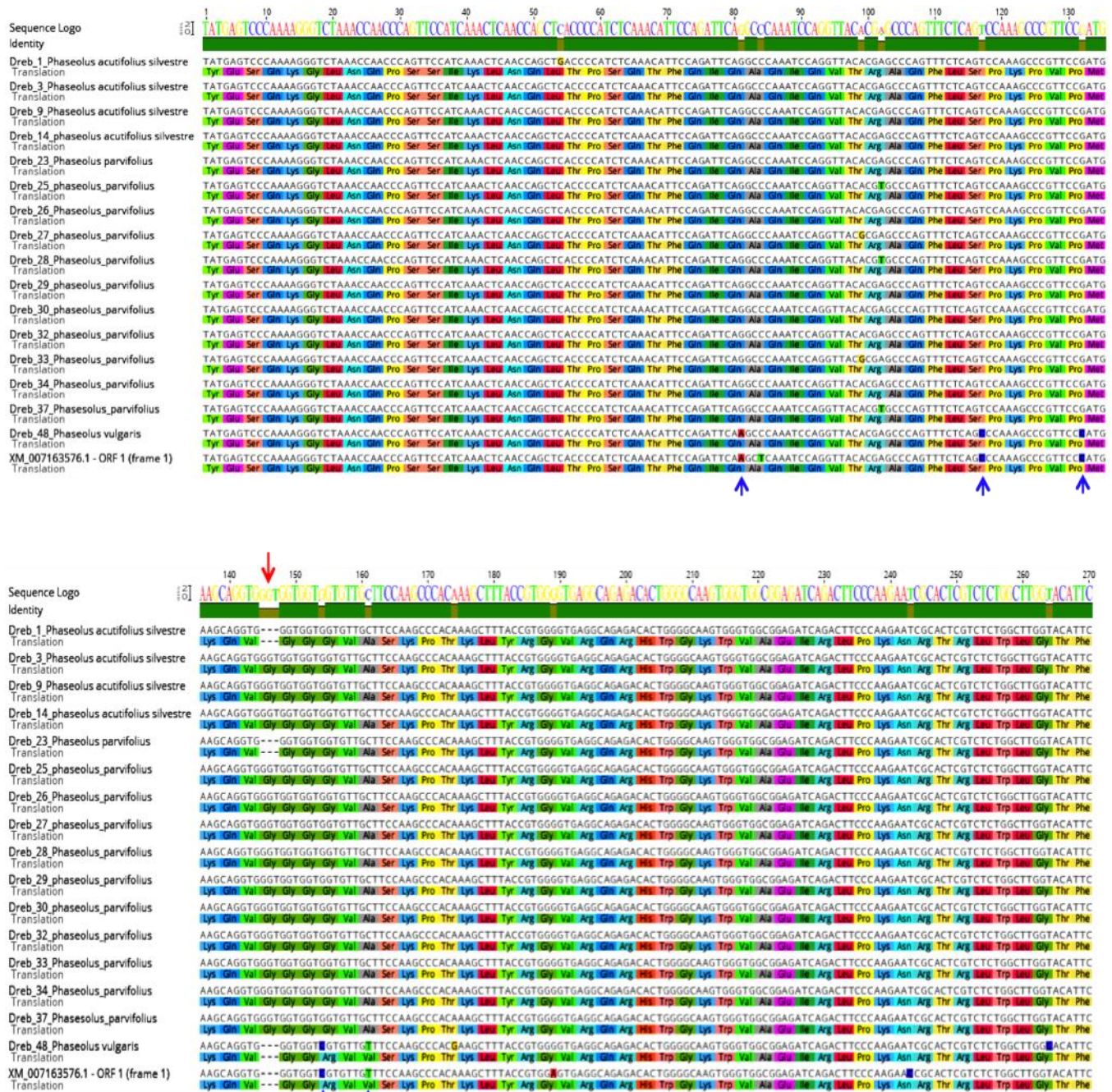
Se pueden observar las diferencias de cambios mutacionales entre las especies para esta región, tomando de referencia la secuencia del RNAm de *P. vulgaris* (XM_007163576.1) obtenida del NCBI. En *Phaseolus acutifolius silvestre* se pueden observar 10 cambios mutacionales, en *Phaseolus parvifolius* se observan 9 cambios mutacionales donde el primer cambio mutacional no se observa, en *Phaseolus acutifolius* cultivado hay 11 cambios mutacionales, en *Phaseolus acutifolius var tenuifolius* se observan 10 cambios mutacionales y la inserción de un codón completo, esta inserción se observa para algunos individuos de *Phaseolus acutifolius silvestre*, *Phaseolus parvifolius* Figura 11.

Figura 11. Alineamiento de *Phaseolus acutifolius* silvestre y *Phaseolus parvifolius* que tienen una inserción de tres nucleótidos (codón) sin cambio de lectura de aminoácidos



Aunque se observa cambios de nucleótidos y estos individuos tenían la inserción de un codón completo, no hay cambio en el marco de lectura y los aminoácidos no cambia por lo tanto son bastante conservados en esta región. Figura 12

Figura 12. Alineamiento de secuencias con inserción de codón, las flechas azules indican cambios en aminoácidos y la flecha roja indica donde ocurre la inserción del codón





- **Determinación de la diversidad haplotípica en Dreb2B**

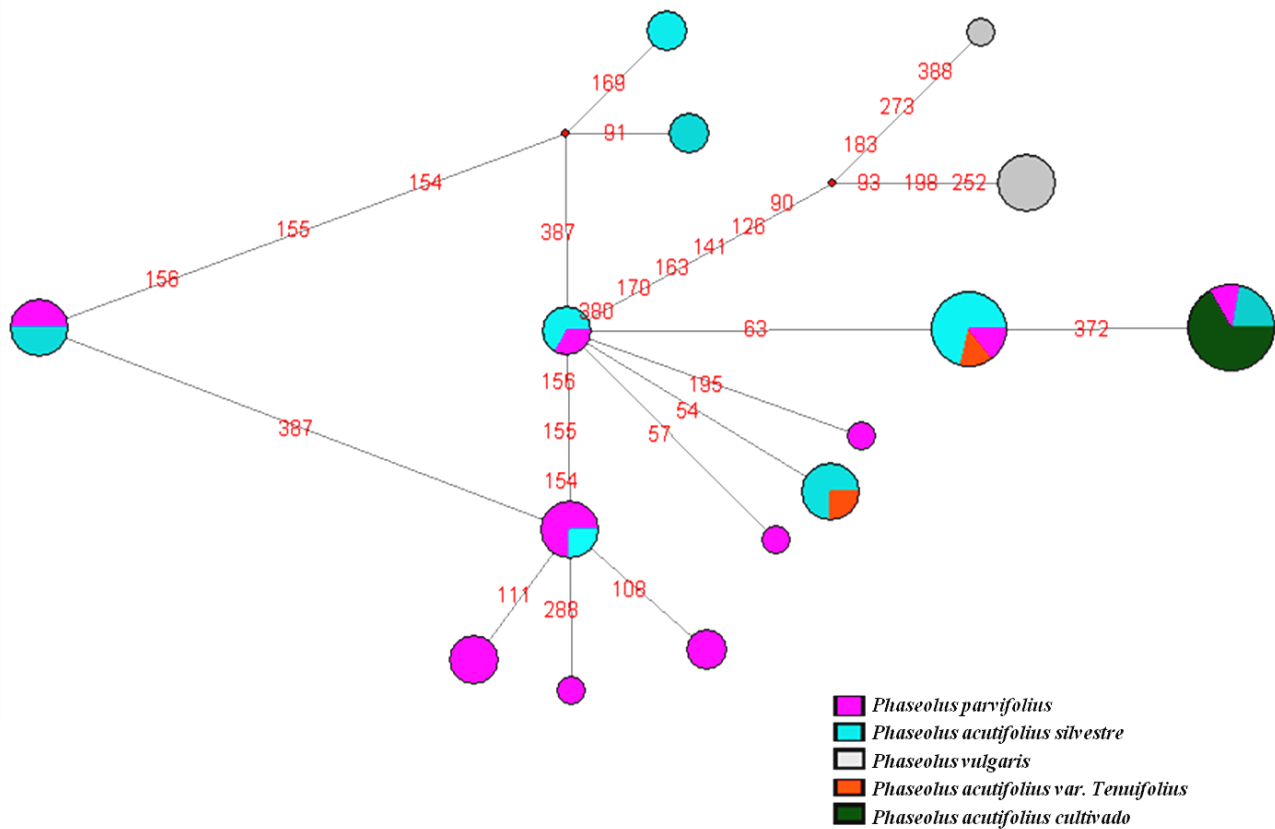
Con las secuencias alineadas se determinó la diversidad haplotípica, de 48 secuencias, encontrando 23 sitios variables, en 14 haplotipos representando una diversidad haplotípica de 0.91952, el haplotipo más frecuente fue el 6 con 9 individuos, el 1 y el 2 con 7 haplotipos cada uno. Todos los individuos de *Phaseolus vulgaris* poseen el haplotipo 14; el haplotipo 1 y 2 tiene 6 individuos de *Phaseolus acutifolius silvestres* y un *P. parvifolius*, los restantes *parvifolius* están en los haplotipos 8 – 12. El Fst de 0.37904, con un número de sitios variables de 23. Las muestras fueron agrupadas de acuerdo a la especie y se determinó la diversidad haplotípica entre estos grupos con se muestra en la Tabla 5. Con el programa Network se gráficaron los haplotipos encontrados para el gen Dreb2B, así como las regiones involucradas para cada muestra Figura 13 y 14.

Tabla 6. Diversidad Haplótica determinada por grupos de especies

No.	Población	No. de secuencias	No. de sitios segregantes	No. De Haplotipos	Diversidad Haplótica
1	<i>P.vulgaris</i>	5	6	2	0.40000
2	<i>P.acutifolius (silvestres)</i>	19	9	8	0.89474
3	<i>P.parvifolius</i>	15	11	10	0.93333
4	<i>P.acutifolius cultivado</i>	6	0	1	0.00000
5	<i>P.acutifolius tenuifolius</i>	3	6	3	1.00000

La diversidad haplotípica más alta se encontró en el grupo *P. acutifolius var tenuifolius* debido a que la cantidad de individuos es poca y la variación entre ellos fue muy alta. Luego el grupo *P. parvifolius* y luego en el grupo *P. acutifolius silvestre*.

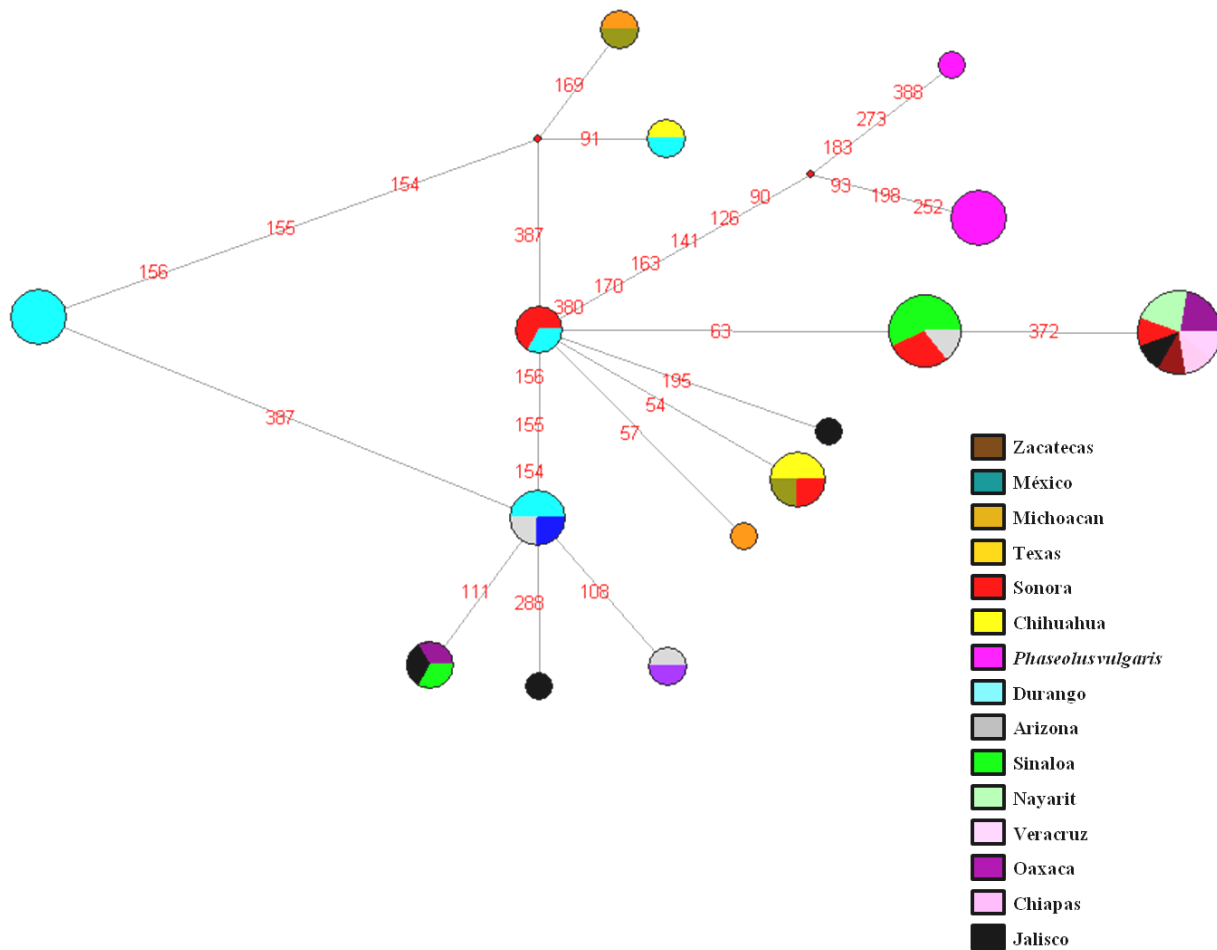
Figura 13.Red Haplótica para el gen Dreb2B



Red Haplotípica para el gen *Dreb2B* con las especies involucradas en cada haplotipo. En la figura 13 se ilustra la diversidad haplotípica encontrada para el gen *Dreb2B* donde el tamaño de las esferas indica la cantidad de muestras encontradas para cada haplotipo. Los números en rojo indican el número del nucleótido donde ocurre el cambio mutacional desde cada genotipo.

En la red haplotípica por especie se observó que hay un haplotipo ancestral o de partida para los demás haplotipos, este haplotipo contiene dos especies: *Phaseolus parvifolius* y *Phaseolus acutifolius silvestre* y luego de este se derivan otros haplotipos, tenuifolius y acutifolius cultivados no muestran diferenciación con *Phaseolus acutifolius silvestre*.

Figura 14. Red Haplotípica considerando la región geográfica para las muestras



En la red de haplotipos para el gen *Dreb2B* clasificadas de acuerdo a regiones se puede observar un haplotipo inicial desde el cual empiezan a dispersarse los demás haplotipos donde la región de este punto es Durango, luego se genera un haplotipo intermedio que contiene dos regiones: Sonora y Durango. Por último hay un haplotipo frecuente que se encuentra en varias regiones: Nayarit, Oaxaca, Zacatecas, Chiapas, Veracruz, Sonora, Jalisco.

- **Composición nucleotídica y aminoacídica**

En el gen *Dreb2B* la composición nucleotídica fue muy variable en todos los individuos evaluados, la mayor variación fue en el grupo de *P. acutifolius silvestre*, los cambios en todas las bases nitrogenadas fueron variables aunque las diferencias no fueron altas. Teniendo en cuenta la cantidad de variación existente en la composición nucleotídica, la composición de aminoácidos no fue variable dentro del grupo de *P. acutifolius*, *Tenuifolius* y *parvifolius* pero si se observan diferencias con la referencia en cambios de aminoácidos en las posiciones señaladas con flechas azules en la figura 12.

La composición nucleotídica fue muy variable en todos los grupos de especies, principalmente en *P. acutifolius silvestre*. Tabla 6.

Tabla 7. Variación de cada nucleótido en las secuencias de *Phaseolus*

Aminoácido	Rango de Variación %
Timina (T)	20.5 – 21.3
Adenina (A)	25.5 – 26.4
Guanina (G)	23.6 – 24.8
Citosina (C)	28.3 – 29.5

Para todas las especies el nucleótido más frecuente en la posición 1 fue citosina, en la posición 2 fue el nucleótido adenina y en la tercera posición fue citosina.

Los aminoácidos más comunes fueron: alanina con 9.2% y leucina con 9.2%, y por otro lado los aminoácidos de menor proporción fueron ácido aspártico con 0.7% y metionina con 0.7% el

resto de aminoácidos se encuentran en un rango entre 3 y 7% a excepción del aminoácido cisteína el cual no fue detectado.

- **Análisis de Coordenadas Principales**

En el análisis de componentes principales explica cómo los individuos están relacionados entre sí en el espacio, considerando 3 ejes, para el gen *Dreb2B* el eje 1 explicó el 37.76%, el eje 2 explicó el 67.31% y el eje 3 explicó el 77.29% de los datos, se observa la distribución por población y como están relacionados en el espacio en dos dimensiones. **Figura 15.** Todas Las Poblaciones se agrupan en dos grupos principalmente, individuos de *parvifolius* (P2) con *Phaseolus acutifolius var. tenuifolius* (P3), *Phaseolus acutifolius var. acutifolius* (P1) y *Phaseolus acutifolius cultivado* (P4). La P5 de *Phaseolus vulgaris* se observa distante al resto de las poblaciones. Estas distancias están soportadas por el índice de distancia genética de Nei, el cual estima el número de cambios mutacionales que a nivel nucleotídico se han acumulado.

Figura 15. Análisis de Coordenadas Principales *Dreb2B*

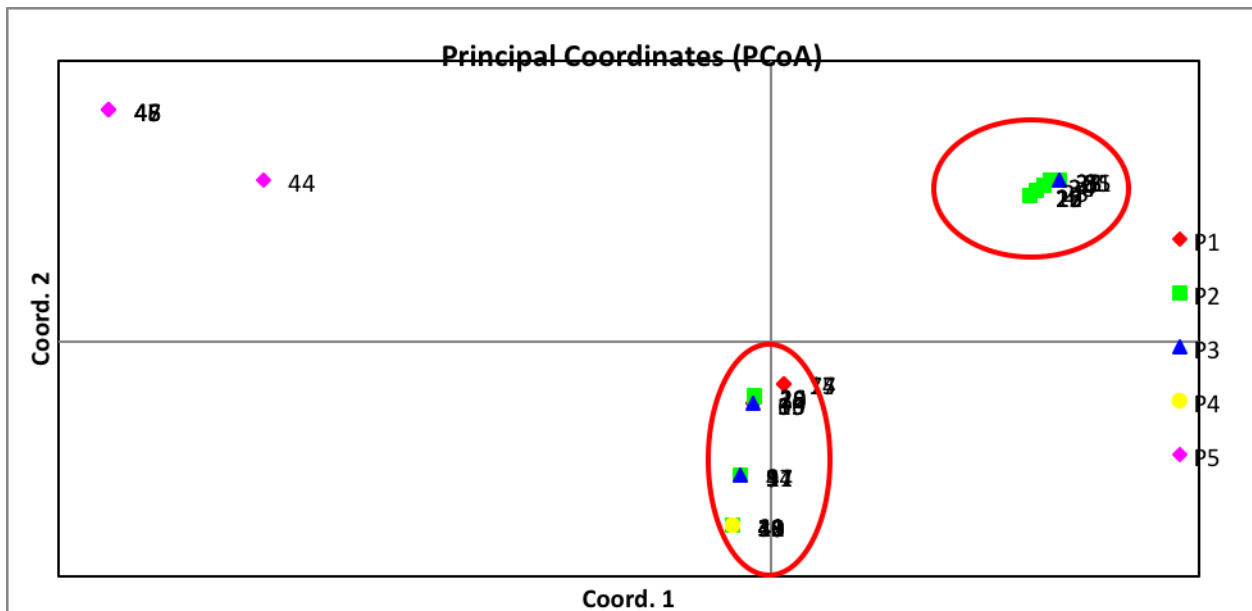


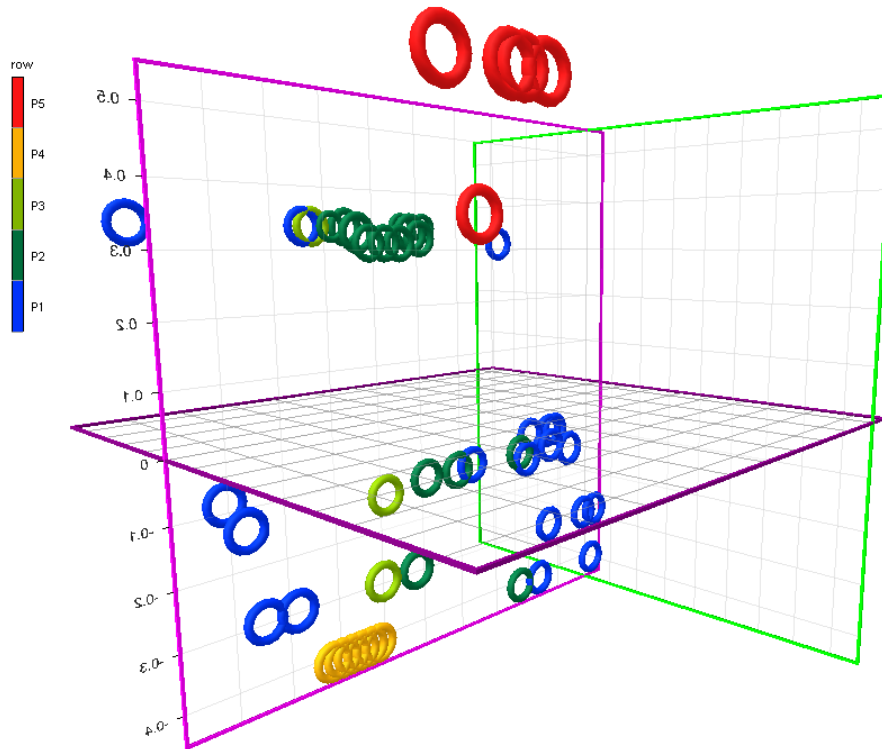
Tabla 8. Distancia Genética de Nei por poblaciones

P1	P2	P3	P4	P5	
0.000					P1
0.002	0.000				P2
0.000	0.002	0.000			P3
0.003	0.007	0.005	0.000		P4
0.020	0.023	0.021	0.024	0.000	P5

Los valores calculados para las poblaciones de estudio son muy bajos por lo que indican que la distancia genética es también muy poca, encontrándose que las poblaciones más distantes son la P4 y P5 (*Phaseolus acutifolius cultivados* y *Phaseolus vulgaris*) con un valor de 0.024 y el valor siguiente en diferencia es entre la P2 y P5 (*Phaseolus parvifolius* y *Phaseolus vulgaris*) con un valor de 0.023. No se encontró diferencia entre P1 y P3 (*Phaseolus acutifolius silvestre* y (*Phaseolus acutifolius var tenuifolius*))

En la gráfica de 3 dimensiones se puede observar detalladamente las distancias entre los grupos

Figura 16. Gráfica en 3 dimensiones de la diferenciación genética entre los individuos de Phaseolus para el gen Dreb2B



En la gráfica en 3 dimensiones de diferenciación genética entre los individuos de *Phaseolus*. P1 (*Phaseolus acutifolius silvestre*) color azul, P2 (*Phaseolus parvifolius*) verde oscuro, P3 (*Phaseolus acutifolius var tenuifolius*) color verde claro, P4 (*Phaseolus acutifolius cultivado*) color amarillo y P5 (*Phaseolus vulgaris*) color rojo.

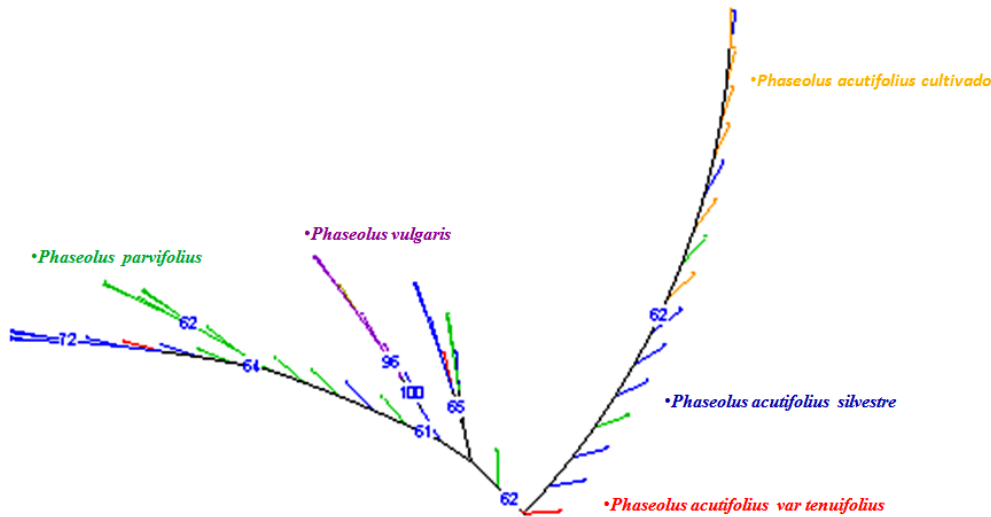
En la gráfica de diferenciación genética se observa que (*Phaseolus acutifolius silvestre*), (*Phaseolus parvifolius*) y (*Phaseolus acutifolius var tenuifolius*) se encuentran bastante relacionados o no hay una diferenciación alta entre ellos, pero el grupo (*Phaseolus acutifolius cultivado*) se encuentra un poco apartado y diferenciado de las demás especies, lo mismo para (*Phaseolus vulgaris*).

- **Análisis de Diversidad Neighbor-Joining**

En el análisis de las distancias genéticas entre las especies se calcularon mediante el árbol Neighbor-Joining construido por el software Darwin versión 5.0, el cual compara las especies que presentan mayor relación y los agrupan de acuerdo a las diferencias que hay entre ellos Figura 17. En este análisis se observan diferencias significativas entre las especies: *Phaseolus*

parvifolius, y *Phaseolus vulgaris*. En cuanto a *Phaseolus acutifolius var tenuifolius* no tiene separación con *Phaseolus acutifolius silvestre*. Los números que se observan en las raíces de los nodos hace referencia al bootstrap o soporte del agrupamiento, cuando el número estaba por debajo de 60 no fue tomado en cuenta.

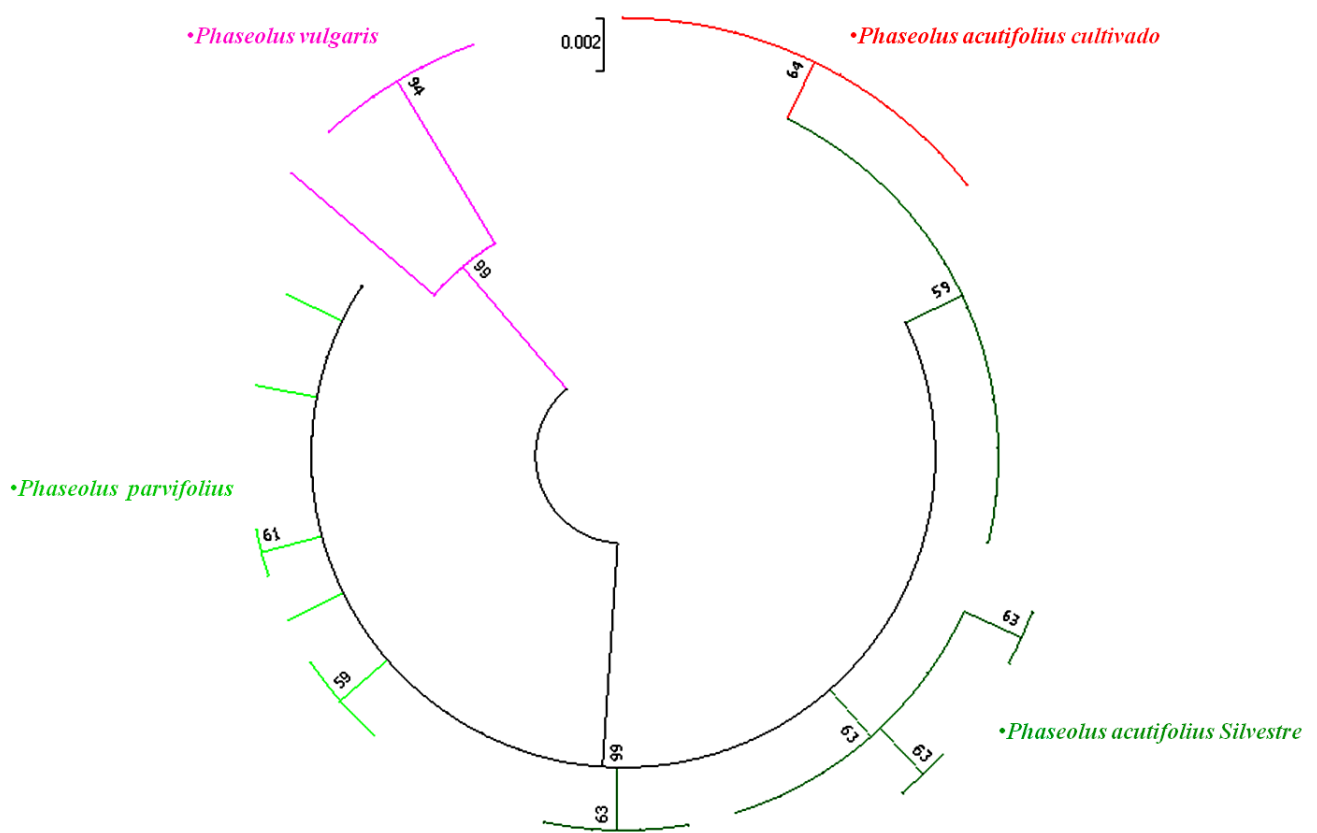
Figura 17. Análisis de Diversidad de Neighbor-Joining



- **Análisis de Máxima Verosimilitud.**

Este análisis pretendió explicar la relación entre individuos pertenecientes a tres especies diferentes del género *Phaseolus*, teniendo en cuenta un modelo evolutivo basado en tasas de cambios mutacionales. En la figura 18 se puede observar la relación entre las especies estudiadas, ya que el programa no considera que hay distancia genéticas entre los individuos de la misma especie para el caso de *Phaseolus acutifolius cultivado*, el grupo de *Phaseolus acutifolius silvestre* que se encuentra agrupado con pocos individuos de *Phaseolus parvifolius*, *Phaseolus acutifolius cultivado* y *Phaseolus acutifolius var tenuifolius* el cual es el que menos diferenciación tiene con *Phaseolus acutifolius silvestre*. En otros grupos se observó el agrupamiento la mayoría de *Phaseolus parvifolius* y una agrupación lejana de *Phaseolus vulgaris*, en este grupo de frijol común se puede ver una diferenciación con el genotipo Bat93 el cual se encuentra diferenciado para este gen con respecto a los demás genotipos.

Figura 18. Análisis de Máxima Verosimilitud



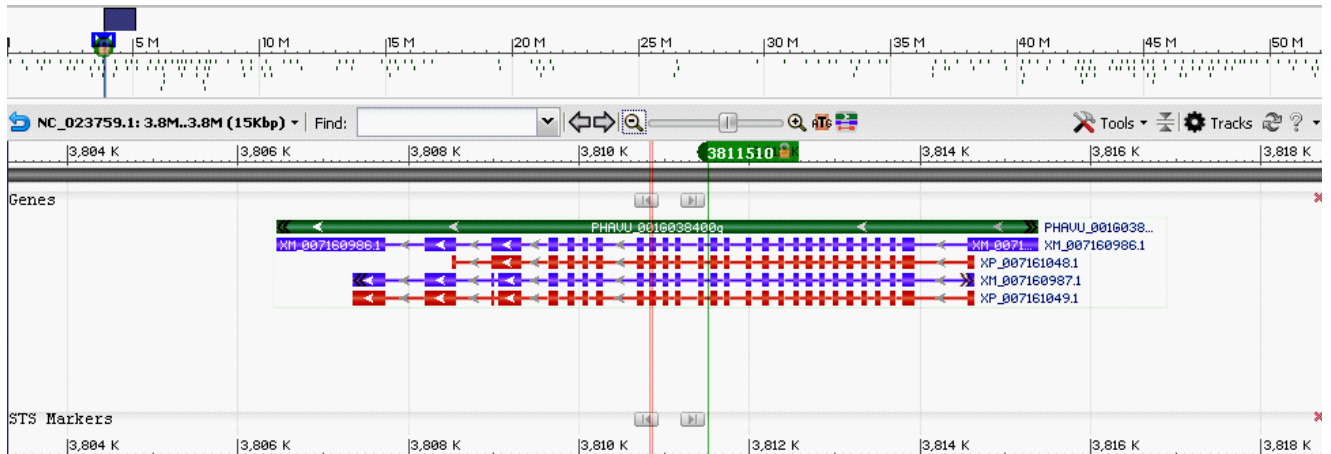
2.1.3. Gen ERECTA

Los genes ERECTA Son (LRR) proteína kinasa tipo receptor serina/treonina, tienen función como reguladores transcripcionales y han sido caracterizados como genes involucrados en la tolerancia a la sequía. El gen se encuentra ubicado en el cromosoma 1, en la posición 3.806.453 hasta la posición 3.815.383 y tiene 8931pb, y la región codificante o CDS tiene 744pb. **Figura 19.** Se analizaron 46 individuos de la colección de *Phaseolus acutifolius*. La región secuenciada tiene aproximadamente 820pb la cual abarcan 4 exones con una longitud de 288pb. Para encontrar la ubicación del gen se extrajo parte de la región secuenciada y se realizó un blast con el cromosoma de referencia de frijol común que se encuentra en el NCBI, con número de referencia de la secuencia NC_023759.1.

Luego de tener la ubicación de la región de interés, se extrajo parte del RNAm y se realizó un alineamiento con cada muestra y se ubicaron los exones **Figura 20.** El primer exón tiene 70pb,

el segundo exón tiene 72pb, el tercer exón tiene 72pb, y el cuarto exón tiene 73pb. Para los análisis realizados se utilizaron solo los exones, por lo tanto se obtuvo una región de 288pb.

Figura 19. Ubicación del Gen ERECTA en el cromosoma 1 de *Phaseolus vulgaris*



En el alineamiento solo se observa un cambio mutacional entre *Phaseolus vulgaris* y todos los demás individuos, este cambio ocurre en el último exón y es sinónima ya que no hay cambio de aminoácido **Figura 21.**

Figura 20. Alineamiento con fragmento de RNAm de *Phaseolus vulgaris* del Gen ERECTA

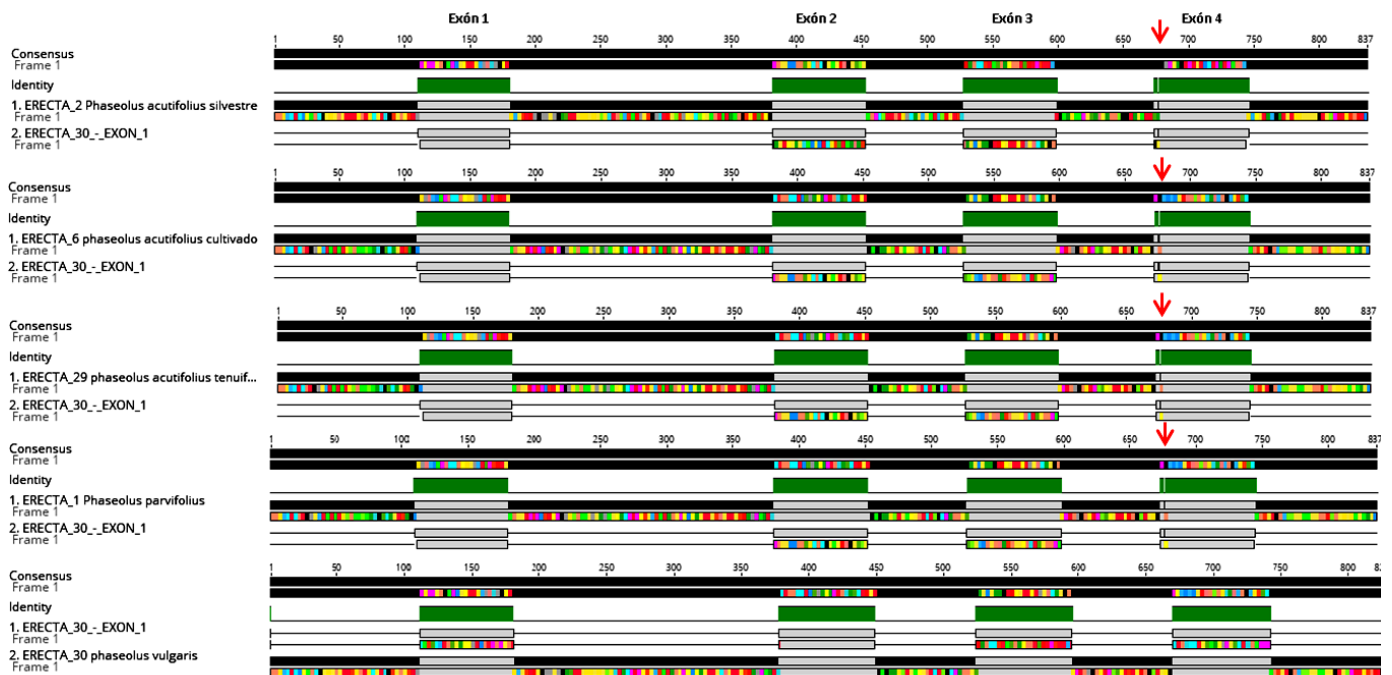
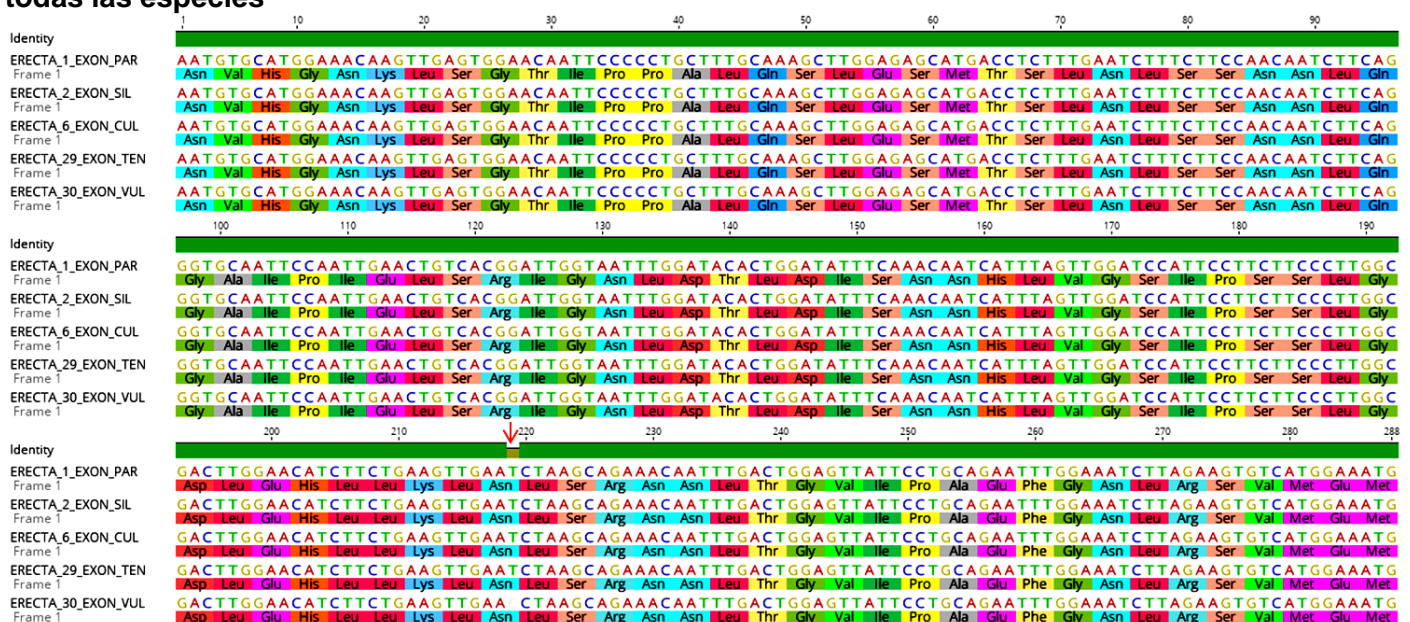


Figura 21. Alineamiento de la región codificante: exón 1, exón 2, exón 3 y exón 4, para todas las especies



La figura 21 muestra la región codificante de 288pb traducida a proteína; donde se puede apreciar que el único cambio evidenciado a nivel de nucleótidos, representó una sinonimia al no alterar la estructura de la proteína con referente a los demás individuos y la secuencia de referencia.

- **Determinación de la diversidad haplotípica**

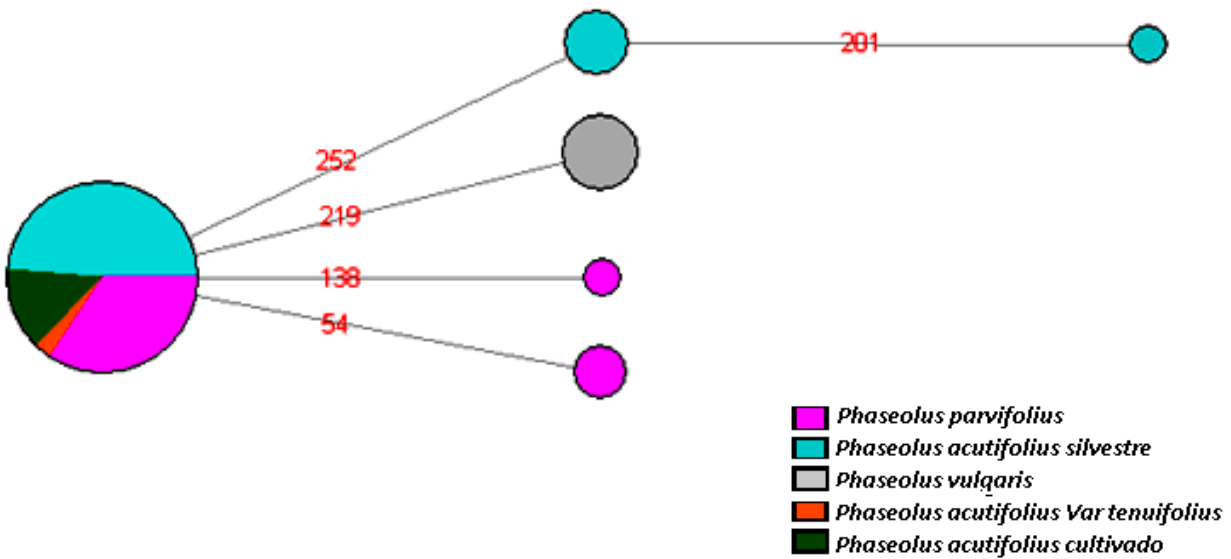
La diversidad haplotípica se determinó en 46 secuencias después de ser alineadas, se obtuvo 288 sitios, y excluyéndose sitios con gaps. Se obtuvieron 6 haplotipos con una diversidad haplotípica de 0.4155 donde el haplotipo más frecuente fue el haplotipo 1 con 35 muestras y el haplotipo 6 con 3 muestras. En el haplotipo 1 se encontraron las muestras de *Phaseolus acutifolius* y *Phaseolus parvifolius*, con 5 sitios polimórficos. Las muestras fueron agrupadas de acuerdo a la especie y se determinó la diversidad haplotípica entre estos grupos con se muestra en el tabla 8. Con el programa Network se graficaron los haplotipos encontrados para el gen *ERECTA*, y se determinó para cada haplotipo las regiones geográficas involucradas por cada muestra Figura 22 y 23.

Tabla 9. Diversidad Haplotípica determinada por grupos de especies

No.	Población	No. de secuencias	No. de sitios segregantes	No. De Haplotipos	Diversidad Haplotípica
1	<i>P.vulgaris</i>	4	0	1	0.00
2	<i>P.acutifolius silvestre</i>	18	2	3	0.215
3	<i>P.parvifolius</i>	15	2	3	0.361
4	<i>P.acutifolius cultivado</i>	8	1	2	0.428

La diversidad haplotípica determinada para el grupo de especies, fue en general baja donde la mayor diversidad fue encontrada en *P.acutifolius cultivado*, en esta región el número de haplotipos fue bajo para todos los grupos. La diversidad nucleotídica en este gen fue de 0.00173.

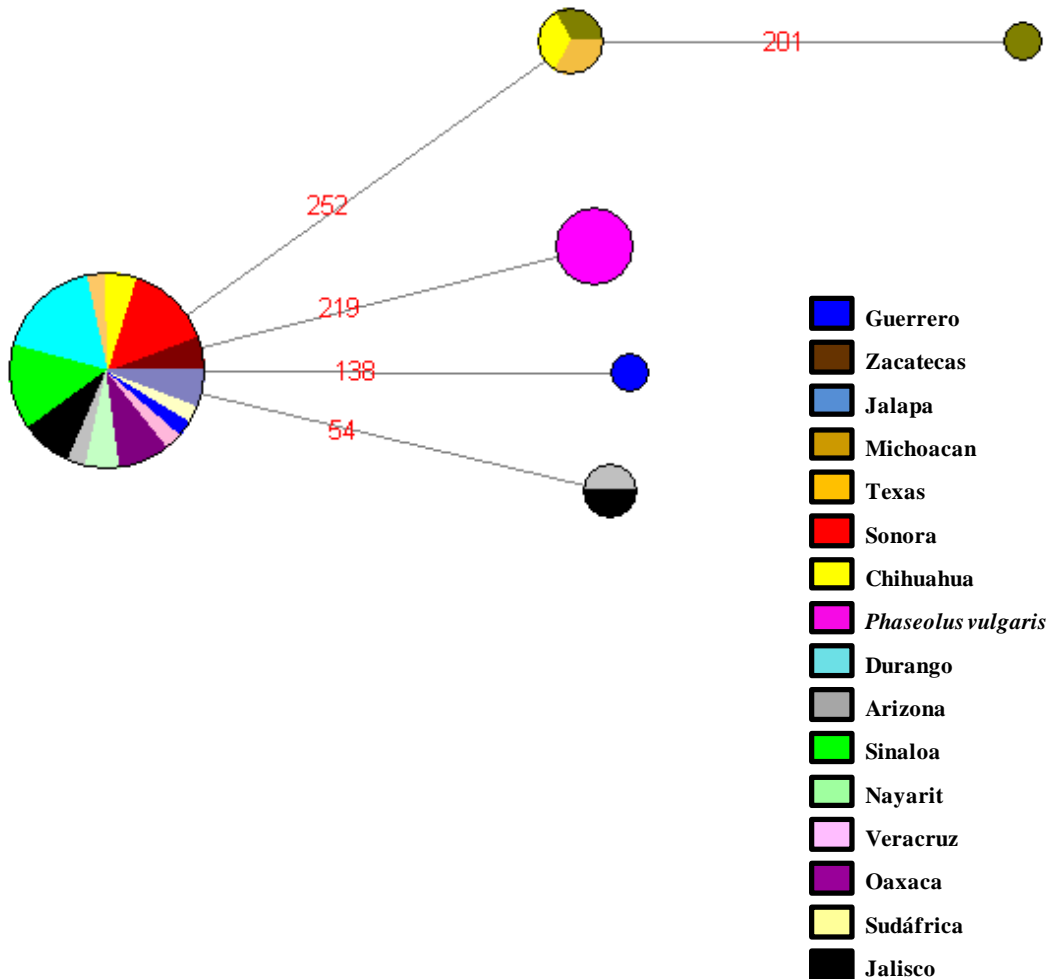
Figura 22. Red Haplótica para el gen ERECTA



En la figura 22 se ilustra la diversidad haplotípica encontrada para el gen ERECTA donde el tamaño de las esferas indica la cantidad de muestras encontradas para cada haplotipo. Los números en rojo indican el número del nucleótido donde ocurre el cambio mutacional desde cada genotipo.

En la red haplotípica por especie se observó que hay un haplotipo ancestral o de partida para los demás haplotipos, este haplotipo contiene dos especies: *Phaseolus parvifolius* y *Phaseolus acutifolius silvestre*, *Phaseolus acutifolius var tenuifolius* y *Phaseolus acutifolius cultivado*, de este se derivan 5 haplotipos donde uno pertenece a *Phaseolus acutifolius silvestre* del cual se deriva otro y dos de *Phaseolus parvifolius* y también el haplotipo de todos los individuos de *Phaseolus vulgaris*.

Figura 23. Red Haplótica considerando la región geográfica para las muestras para el gen *ERECTA*.



El haplotipo de inicio contiene individuos de varias regiones, encontrándose la mayoría en Sonora, Durango y Sinaloa, luego se pueden observar la dispersión de los haplotipos desde este punto de inicio donde hay haplotipos de la región de Michoacan, Texas y Chihuahua, el siguiente haplotipo de la región de Guerrero y otro haplotipo de la región de Jalisco y Arizona. Los números en rojo indican los cambios mutacionales y la ubicación de un haplotipo a otro; y para este gen desde el haplotipo inicial hacia los haplotipos derivados, solo hay un cambio mutacional

- **Composición nucleotídica y aminoacídica**

Al comparar la composición nucleotídica en las muestras evaluadas se observó una mayor variación en los individuos de *P. acutifolius silvestre*, donde hay cuatro individuos con composición diferente, en los individuos de *P. vulgaris*, no hubo cambios en la composición nucleotídica ni tampoco entre los individuos de *P. parvifolius* Tabla 9.

Tabla 10. Comparación de la Composición Nucleotídica entre las especies de Phaseolus. Porcentaje de Timina (T), Citosina (C) Adenina (A), Guanina (G). Número total de nucleótidos.

Especie	T %	C%	A%	G%	TOTAL
1. <i>P.vulgaris</i>	31.3	19.4	28.8	20.5	288
2. <i>P.acutifolius</i>	31.3	19.1	29.2	20.5	288
3. <i>P.acutifolius</i>	31.6	19.1	28.8	20.5	288
5. <i>P.acutifolius cultivado</i>	31.6	19.1	28.8	20.5	288
6. <i>P.acutifolius var. Tenuifolius</i>	31.6	19.1	28.8	20.5	288
7. <i>P.parvifolius</i>	31.6	19.1	28.8	20.5	288
8. <i>P.parvifolius</i>	31.3	19.4	28.8	20.5	288
9. <i>P.parvifolius</i>	31.7	18.8	29.3	20.2	288

La composición nucleotídica en la especie *Phaseolus vulgaris* fue la misma en todos los individuos por lo tanto se muestra solo un representante, para el caso de *Phaseolus acutifolius silvestre* se encontraron dos diferentes composiciones nucleotídicas donde hay cambios en porcentaje de timinas y adeninas, para el caso de *Phaseolus acutifolius cultivado* y *Phaseolus acutifolius var tenuifolius* no se presentaron cambios en los diferentes individuos, *Phaseolus parvifolius* se presentó tres composiciones diferentes con de cambio de porcentajes de timina, citosina, guanina y adenina. El nucleótido que presentó menos cambios entre todos los individuos fue la guanina. Los cambios representados en la composición nucleotídica se ve reflejada en la composición aminoacídica la cual es aún más estable para este gen y hubo solo

una variación en la especie *Phaseolus parvifolius*, por lo tanto se realizó un análisis de distancias entre los grupos tabla 10.

Tabla 11. Análisis de Distancias entre grupos por Composición Aminoacídica

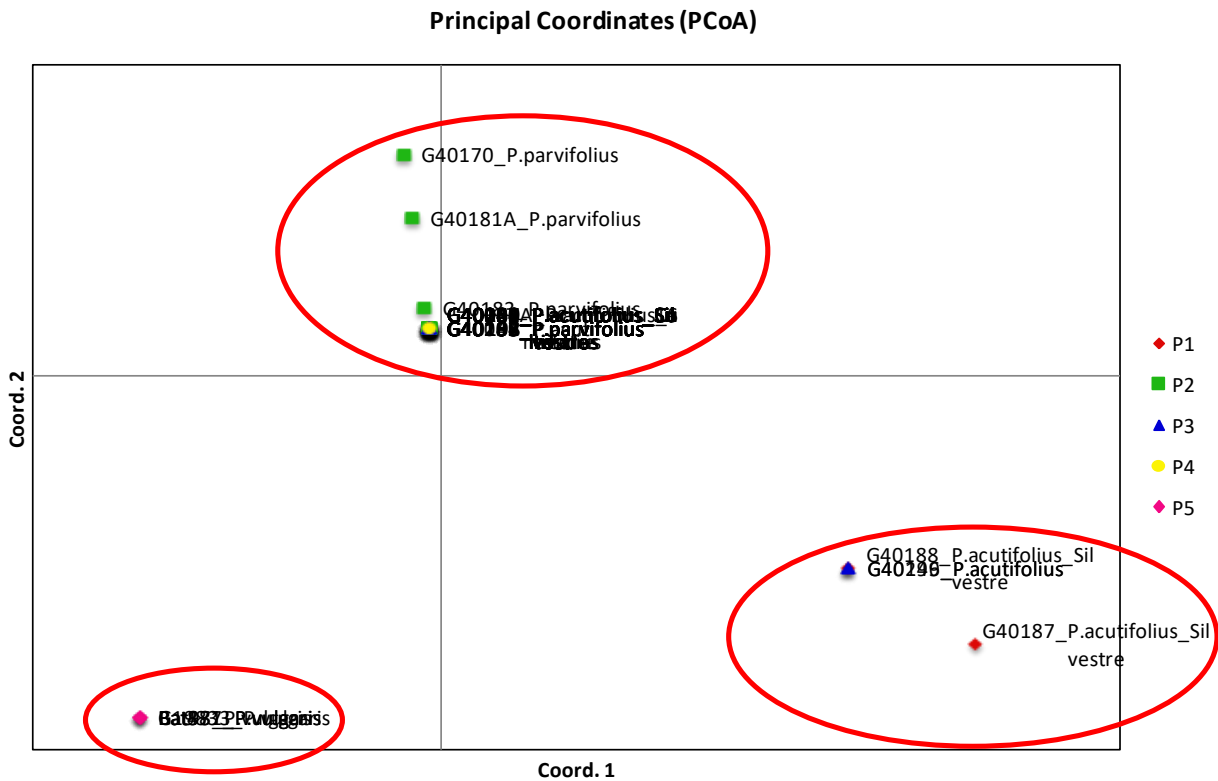
Especies 1	Especies 2	Distancia	Error Estándar
<i>P.vulgaris</i>	<i>P.acutifolius cultivados</i>	0.000	0.000
<i>P.vulgaris</i>	<i>P.parvifolius</i>	0.000	0.000
<i>P.acutifolius cultivados</i>	<i>P.parvifolius</i>	0.000	0.000
<i>P.vulgaris</i>	<i>P.acutifolius silvestre</i>	0.000	0.000
<i>P.acutifolius cultivados</i>	<i>P.acutifolius silvestre</i>	0.000	0.000
<i>P.parvifolius</i>	<i>P.acutifolius silvestre</i>	0.000	0.000
<i>P.vulgaris</i>	<i>P.tenuifolius</i>	0.000	0.000
<i>P.acutifolius cultivados</i>	<i>P.tenuifolius</i>	0.000	0.000
<i>P.parvifolius</i>	<i>P.tenuifolius</i>	0.000	0.000
<i>P.acutifolius silvestre</i>	<i>P.tenuifolius</i>	0.000	0.000

En la composición aminoacídica no se encontró ninguna diferencia entre los grupos de poblaciones para el gen *ERECTA*.

- **Análisis de Coordenadas Principales**

En el análisis de coordenadas principales se explica cómo los individuos están relacionados entre sí en el espacio, considerando 3 ejes, donde el eje 1 explicó el 34.40%, el eje 2 explicó el 63.11% y el eje 3 explicó el 83.16% de los datos, se observa la distribución por población y como están relacionados en el espacio en dos dimensiones. Figura 24. La población P2 (*Phaseolus parvifolius*) presenta algunas divergencias dentro de la población, por lo tanto se encuentra mayor variabilidad y se observan distribuidos en una pequeño área del gráfico, encontrándose similitud con la población 3 (*Phaseolus acutifolius cultivados*) y la población 4 (*Phaseolus acutifolius var. tenuifolius*), en cuanto a la población 1 (*Phaseolus acutifolius silvestre*) hay cierta similitud con la población 3. Y por último la población más distante es la población 5 (*Phaseolus vulgaris*), la distancias entre estas se pueden visualizar más fácil con una representación de su distribución en el espacio Figura 25.

Figura 24. Gráfica del Análisis de Coordenadas Principales



En la gráfica de coordenadas principales se puede observar la distribución de los individuos de acuerdo a la agrupación y como se encuentran relacionados entre ellos, se pueden observar tres grupos

La variabilidad se estimó con el índice de distancia genética de Nei, el cual considera el número de cambios mutacionales que a nivel de nucleótido se han acumulado Tabla 11. Los valores de distancia fueron cero entre todas las poblaciones y la única diferenciación que hubo fue con la especie *Phaseolus vulgaris* la cual se considera como distante Figura 26.

Tabla 12. Distancia de Nei por poblaciones

P1	P2	P3	P4	P5	
0.000					P1
0.000	0.000				P2
0.000	0.000	0.000			P3
0.000	0.000	0.000	0.000		P4
0.004	0.004	0.004	0.003	0.000	P5

P1: *Phaseolus acutifolius* Silvestre

P2: *Phaseolus parvifolius*

P3: *Phaseolus acutifolius* cultivados

P4: *Phaseolus acutifolius* var *Tenuifolius*

P5: *Phaseolus vulgaris*

Figura 25. Análisis de Coordenadas Principales de acuerdo a la Distancia Genética de Nei

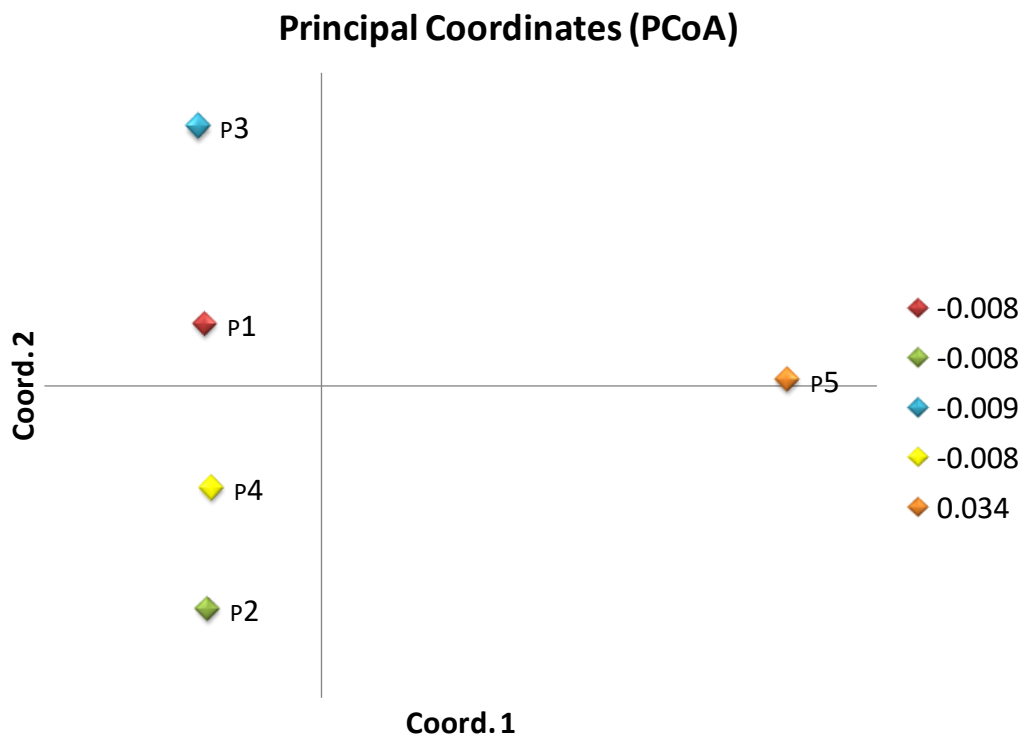
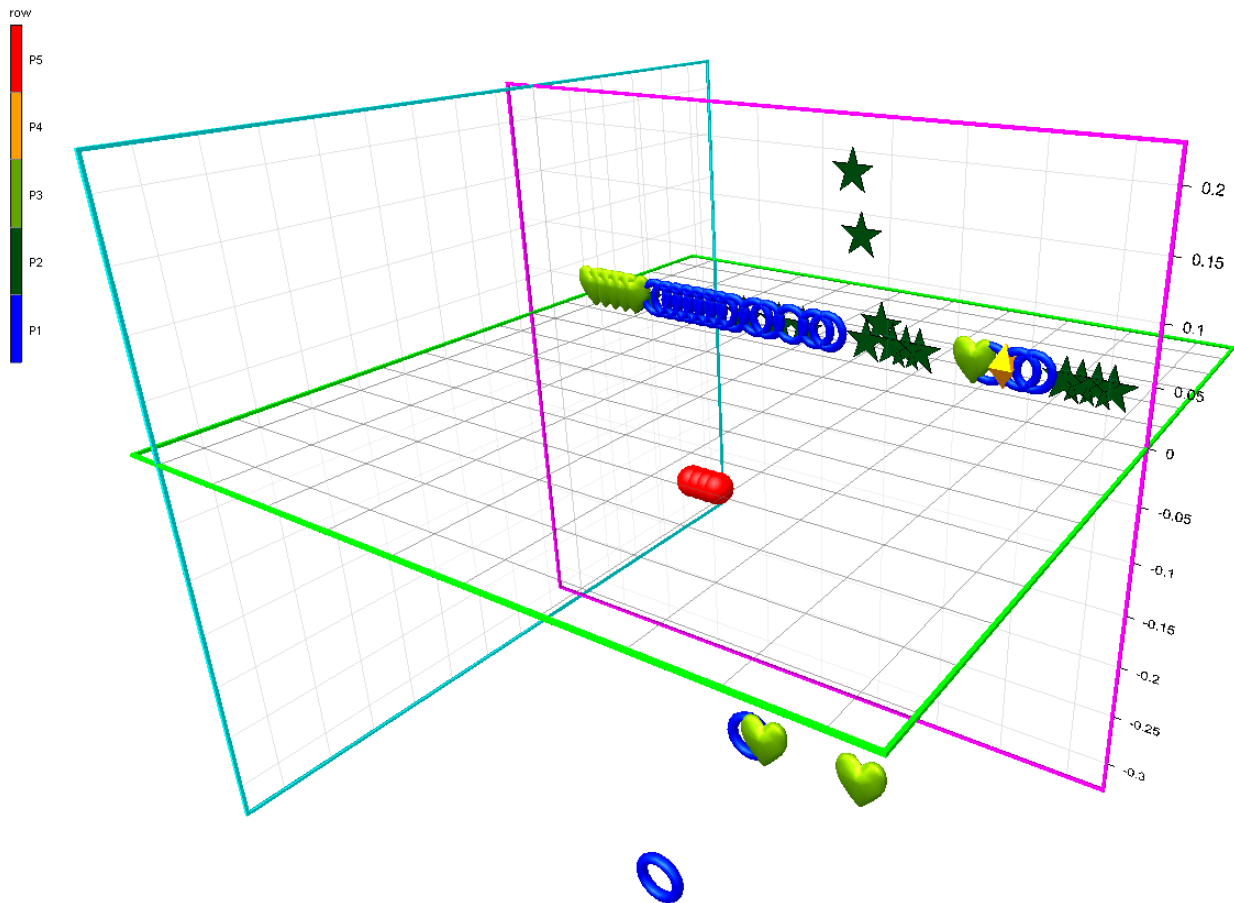


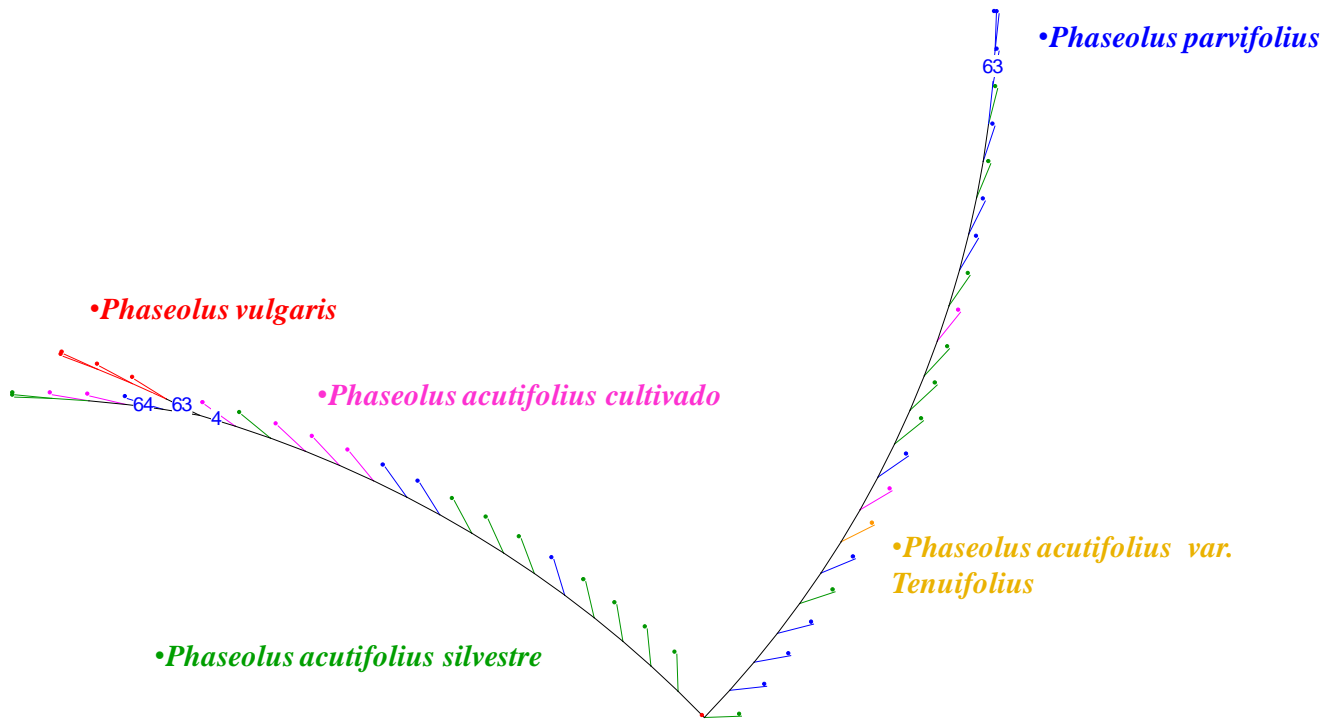
Figura 26. . Gráfica en 3 dimensiones de la diferenciación genética entre los individuos de *Phaseolus* para el gen ERECTA



- **Análisis de Diversidad Neighbor-Joining**

En el análisis de las distancias genéticas entre las especies se calcularon mediante el árbol Neighbor-Joining construido por el software Darwin versión 5.0, el cual compara las especies que presentan mayor relación y los agrupan de acuerdo a las diferencias que hay entre ellos Figura 27. En este análisis se observan las diferencias entre cada grupo de especies, en la agrupación entre especies todas se encuentran muy relacionadas y se observa la diferenciación con *Phaseolus vulgaris*. Los números en las raíces de los nodos hace referencia al bootstrap o soporte del agrupamiento, cuando el número estaba por debajo de 60 no fue tomado en cuenta.

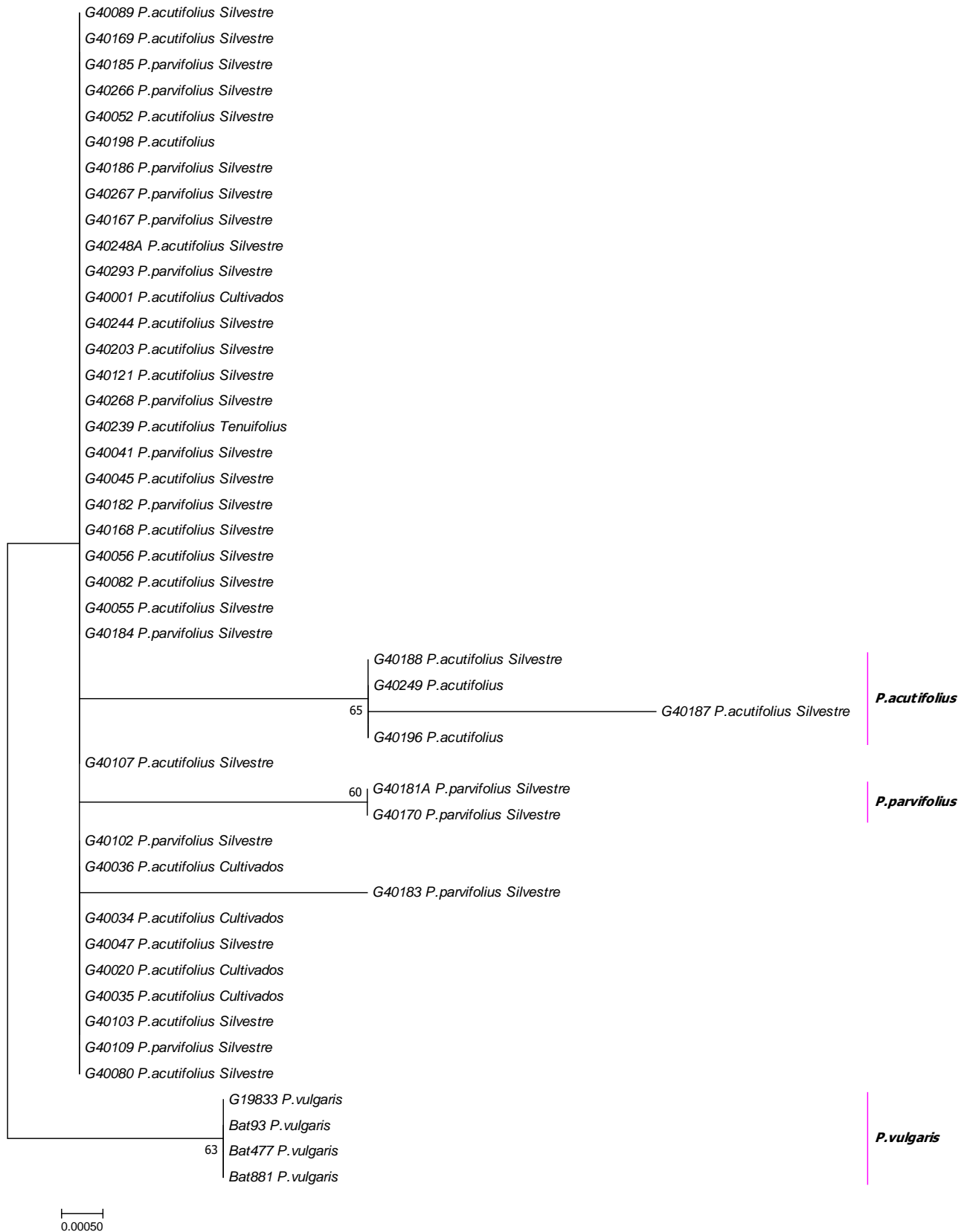
Figura 27. Análisis de Diversidad de Neighbor-Joining gen *ERECTA*



- **Análisis de Máxima Verosimilitud**

En este análisis se pretendió explicar la relación que se tienen entre los individuos pertenecientes a tres especies diferentes del género *Phaseolus* teniendo en cuenta un modelo evolutivo basado en la tasa real de los cambios mutacionales que se detectan en las secuencias de ADN. En la **figura 28** se puede observar la relación entre las especies estudiadas. Debido a que las diferencias son pocas en este gen entre los diferentes individuos se observa un grupo mezclado de todas las especies y algunos grupos definidos de cada especie, es decir que no se encontró gran diferenciación entre *Phaseolus acutifolius silvestre*, *Phaseolus acutifolius cultivados*, *Phaseolus acutifolius var tenuifolius*. Pero si una clara diferenciación con *Phaseolus vulgaris*.

Figura 28. Análisis de Máxima Verosimilitud de tres especies de Phaseolus



2.2. Discusión

La sequía es una de las problemáticas más limitantes en la producción agrícola, considerando que el cambio climático afecta los cambios de frecuencia de las precipitaciones, temperaturas etc. reflejándose así la escasez del agua por la falta de lluvias en periodos extensos (Pace *et al.* 2013). Este recurso es vital para el desarrollo de los procesos fisiológicos de las plantas, como el crecimiento, la reproducción y la producción de alimento. Generalmente las plantas tienen mecanismos de respuesta a diferentes tipos de estrés, biótico o abiótico que contribuyen a la sobrevivencia de la planta en condiciones adversas. Hay especies que presentan mayor diversidad en cuanto a las respuestas ambientales favorables o no y por lo tanto una sobrevivencia más alta respecto a otras especies, por lo tanto es importante el estudio de especies silvestres con este tipo de características para la sustentabilidad de la producción alimentaria.

El frijol común es la leguminosa más importante de grano para el consumo humano ya que tiene alta fuente de proteína, vitaminas y minerales (Beebe 2012). La sequia en el frijol común afecta algunos procesos de la planta donde reduce la biomasa de dosel, rendimiento de la semilla, número de vainas y semillas, peso de las semillas y días de maduración (Beebe *et al.* 2013). Por lo tanto es importante conocer acerca de los parientes silvestres, como frijol tépari *Phaseolus acutifolius* el cual tiene la cualidad de crecer en ambientes poco favorables para el frijol común, y relacionar la información a nivel genómico y su relación con la capacidad de respuesta fisiológica de la especie a estos ambientes (Gujaria-Verma *et al.* 2016).

La diversidad y polimorfismo provenientes de los genes se analizaron considerando los cambios obtenidos en los exones de los genes evaluados, de esta forma discriminar las mutaciones que ocurren en la región codificante y por lo tanto la posible función y respuesta de estos para contrastarlos entre frijol tepari y frijol común.

En el caso del gen *ASR2* los cambios de composición nucleotídica entre *Phaseolus acutifolius*, *Phaseolus parvifolius* y *Phaseolus vulgaris* fue a nivel de un solo nucleótido, para el caso de *Phaseolus acutifolius* el cambio fue en el exón 2 nucleótido 243 y para *Phaseolus parvifolius* en el exón 1 nucleótido 15. Este gen fue conservado en las variaciones obtenidas, donde los cambios de nucleótidos ocurrieron en el tercer nucleótido del codón significando una mutación sinónima o ningún cambio de aminoácido, en el caso de el gen *Dreb2B* donde se obtuvieron

mayores variaciones dentro de los individuos de *Phaseolus acutifolius* silvestre, sucede lo mismo, teniendo en cuenta que los cambios mutacionales fueron entre 9 y 11, lo cual es mucho mayor que en *ASR2*, estas sustituciones a nivel de nucleótido son también sinónimas y de todas las sustituciones encontradas solo hay 2 cambios de aminoácidos. En este gen se encontraron algunos individuos de *Phaseolus acutifolius* silvestre y *Phaseolus parvifolius* la inserción de un codón que no afecta el marco de lectura de la secuencia, ni de los aminoácidos siguientes a la inserción, en este tipo de eventos se ha documentado el incremento de las tasas de mutación de los nucleótidos cercanos a un evento de inserción - deleción, donde estas mutaciones no solo contribuyen a la variación entre sitios en las tasas evolutivas, si no también tienen el potencial de contribuir con las tasas de evolución diferencial entre los linajes (Gaut *et al.* 2011).

Para este mismo gen se encontraron 17 cambios mutacionales, teniendo en cuenta todos los cambios entre todos los individuos, se encontró que más del 60% fueron transiciones, este resultado comprueba que debido a la composición química de los nucleótidos, que están caracterizados por la base bioquímica de la mutación, es más probable la sustitución en las transiciones. Se conoce bien el hecho que durante la evolución de la secuencia de ADN la tasa de cambios transicionales difiere de la tasa de cambios transversionales, las transiciones generalmente ocurren más frecuentemente que las transversiones. Esta diferencia se refiere a menudo como un sesgo de las transiciones, y la estimación de la extensión de este sesgo en las transiciones podría ser de interés debido a que esta puede variar para los diferentes organismos y para diferentes genes dentro de un grupo de organismos, es por lo tanto importante conocer las tasas de variación por que ayudan a entender los patrones de evolución molecular (Strandberg & Salter 2004)

Según los estudios realizados en evolución molecular sobre las mutaciones y cambios puntuales, utilizando comparaciones entre las secuencias de aminoácidos, se descubrió que algunas características sobre la evolución de las proteínas, donde los residuos de los aminoácidos varían en su dinámica evolutiva y algunos son invariantes, por lo que se propone codifican aspectos críticos de la función de dicha proteína, mientras que los otros son evolutivamente lábiles, por lo tanto las tasas evolutivas son iguales a la tasa de mutación neutra y de acuerdo a esto se estableció que las velocidades de evolución molecular varían entre sitios (aminoácidos y proteínas) y que las tasas evolutivas varían entre los sitios por selección natural que actúa diferencialmente entre sitios, como los cambios no sinónimos que

evolucionan más lentamente que los sitios sinónimos, esto debido a que los reemplazos de aminoácidos son funcionalmente limitados (Gaut *et al.* 2011).

Por otra parte en este estudio se consideraron tres especies las cuales fueron comparadas entre sí con la referencia de un RNAm de *Phaseolus vulgaris* reportado por (Schmutz *et al.* 2013), (gen *ASR2* y *Dreb2B*), en el alineamiento múltiple del gen *ASR2* se encontró que el intrón en las especies silvestres de *Phaseolus acutifolius* y *Phaseolus parvifolius* es 24 pb mas grande que en *Phaseolus vulgaris* el cual fue también reportado por (A. Cortés *et al.* 2012), esta diferencia en longitud podría estar relacionada con la presión de selección de los genes a las que se ha sometido el frijol común y estar relacionado particularmente con los múltiples procesos de domesticación que ha sufrido, por lo tanto se podría considerar que el gen *ASR2* es un gen ortólogo, ya que los intrones aparecen en las mismas posiciones y delimitan exones de tamaños similares y en su mayoría el tamaño de los genes está relacionado con el tamaño de los intrones (Long 2002).

Para el caso del gen *ERECTA*, no fue posible obtener referencia del gen por lo tanto se realizó la anotación desde el cromosoma 1 del genoma de referencia de *Phaseolus vulgaris* G19833 del gen donde se encuentra ubicado, este resultó mucho más conservada que los otros dos genes teniendo en cuenta que la evaluación incluyó 4 exones del gen y solo hubo un cambio mutacional para todas las especies, para lo cual la mutación resultó ser sinónima y sin ningún cambio de aminoácido para ninguna de las tres especies, esta característica de poca variación se respaldó con los resultados de las distancias genéticas de Nei, el cual considera el número de cambios mutacionales que a nivel de nucleótido se han acumulado, estas distancias en los tres genes fueron bajas con distancias menores a 0.1 entre las diferentes poblaciones de las especies estudiadas, lo cual se corrobora con las pocas variaciones que ocurren en las regiones codificantes. Lo que en la teoría se ha estudiado en los cambios evolutivos en las regiones codificantes, considerando que las proteínas que son los productos de la transcripción y traducción de genes, los cambios evolutivos de estos pueden ser examinados con las secuencias de aminoácidos de las proteínas, y en la teoría de la evolución molecular las sustituciones en los aminoácidos son menos frecuentes en proteínas funcionalmente importantes (Nei 2005).

Para el estudio de los tres genes en *Phaseolus acutifolius*, la cual no se tienen reportes del estudio de genes candidatos tolerantes a sequia, se tomó como referencia el genoma de

Phaseolus vulgaris; para los genes *ASR2* y *Dreb2B* se tomaron de referencia RNAm, se realizó un alineamiento con las secuencias de diferentes genotipos de *Phaseolus vulgaris* secuenciados en este estudio: Bat477, Bat93, G19833 y Bat881, al encontrar total coincidencia se realizaron las anotaciones de la ubicación de las regiones en el NCBI y se delimitaron las secuencias codificantes y los intrones para estimar la ubicación de estas. Teniendo esto en cuenta se puede relacionar con las altas similitudes con el genoma de *Phaseolus vulgaris* y resaltando el carácter ancestral que se obtuvo al analizar los cambios en la región codificante.

Para el gen *ASR2* se encontró una diversidad haplotípica muy baja, en relación a la especie *Phaseolus acutifolius* se encontraron dos haplotipos y para las especies *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus parvifolius* solo un haplotipo. Cada especie presentó solo un punto mutacional, la variedad *Phaseolus acutifolius* var. *tenuifolius* presentó el mismo haplotipo que *Phaseolus acutifolius*, esto se ve reflejado en el número de sitios polimórficos ya que en *Phaseolus acutifolius* fue 1 y en *P.vulgaris* y *P.parvifolius* no hubo cambios. El primer haplotipo encontrado para *Phaseolus acutifolius* se encuentra en 9 regiones geográficas de México y una región de EEUU, y el otro haplotipo de esta especie perteneciente a la región de Sinaloa. En *P. parvifolius* el único haplotipo para este gen fue más frecuente en la región de Durango, Jalisco, Arizona y Guerrero, probablemente este haplotipo se encuentra relacionado con la concentración de las variedades silvestres los cuales están concentradas en desiertos marginales semiáridos de Sonora y Chihuahua.

En el gen *Dreb2B* el número de sitios segregantes fue mayor, en *P.parvifolius* fue de 11, *P.acutifolius silvestre* 9, *P.vulgaris* 2 y *P.acutifolius cultivado* 1. En este mismo orden se obtuvieron la mayor cantidad de haplotipos, en la red haplotípica obtenida se encontró un haplotipo de origen que comparten: *P.acutifolius silvestre* y *P.parvifolius* en la misma proporción, de este haplotipo divergen otros dos, uno de los cuales se encuentra la especie *P.parvifolius* con otros haplotipos derivados, el otro haplotipo está conformado por *P.acutifolius silvestre*, y desde el haplotipo de origen hasta los haplotipos de *P.vulgaris* se encuentran muchos cambios mutacionales identificándose para esta especie dos haplotipos, el haplotipo *P. acutifolius* var. *tenuifolius*, menos divergente incluso que el haplotipo donde se encuentra *P. acutifolius cultivado* compartido con *P. acutifolius silvestre* y *P. parvifolius*.

Al realizar la revisión de la distribución geográfica de los haplotipos se encontró que el haplotipo de origen tiene una región: Durango la cual es la misma para los primeros haplotipos

de la red. El último haplotipo de la red es muy diverso en regiones, encontrándose: Sonora, Nayarit, Zacatecas, Jalisco, Chiapas, Veracruz y Oaxaca. Para el caso del gen *ERECTA* hay un genotipo de origen con varios individuos: *P. acutifolius silvestre*, *P. vulgaris*, *P. acutifolius cultivado* y *P. acutifolius var. tenuifolius*, de este genotipo se extienden solo 4 haplotipos mas, dos de *P. parvifolius*, un haplotipo de *P. acutifolius silvestre* el cual contiene un haplotipo, los cambios mutaciones fueron solo 1 a partir del haplotipo de origen, en cuanto a las regiones geográficas en el haplotipo de origen se encuentra disperso en muchas regiones geográficas de México, Sudáfrica y Arizona.

La importancia de variedades de tépari para las tribus indígenas del desierto de Sonora y la presencia de tépari silvestre en regiones inter-montañas de estas tierras, apunta a que esta región es el centro de diversidad de la especie, así como también el centro de origen. La domesticación de *Phaseolus acutifolius* involucra un solo evento geográfico limitado, participando dos o más eventos independientes que conducen a diferencias en las frecuencias alélicas entre silvestres y domesticados y por lo tanto la domesticación independiente de *Phaseolus acutifolius* en diferentes regiones geográficas (Garvin & Weeden 1994).

Como se había mencionado anteriormente, realizando las comparaciones de distancias genéticas, diversidad haplotípica y las redes haplotípicas, la variabilidad de las poblaciones por el análisis de coordenadas principales, las cuales se observa cada especie agrupada y corroborando con el gráfico en 3 dimensiones (Figura 7) se observa la discriminación en grupos definidos debido al único cambio entre los individuos, aunque aquí se observa a *Phaseolus acutifolius var. tenuifolius* en el grupo de *Phaseolus acutifolius silvestre* y no se muestra separación, lo que se puede inferir que esta variedad comparte un grado similitud bastante alto con los silvestres teniendo en cuenta este gen y concuerda con los análisis de diversidad reportado por (Muñoz *et al.* 2006). En el análisis de diversidad de Neighbor-Joining y el análisis de máxima verosimilitud respalda nuevamente la agrupación de los individuos (Figura 8).

De acuerdo a los análisis obtenidos se clasifica este gen *ASR2* con nivel de polimorfismo bajo y con cambios mutacionales específicos para las especies, obteniéndose un cambio mutacional para cada especie considerada *Phaseolus acutifolius*, *Phaseolus parvifolius* respecto a la referencia: *Phaseolus vulgaris*, donde los sitios polimórficos en los exones es muy bajo reportado así por (A. Cortés *et al.* 2012), pero en este caso para las tres especies, posiblemente estos resultados en las regiones codificantes están relacionadas con la

funcionalidad de gen *ASR2*, ya que como es dependiente de ABA, que esta principalmente involucrado en la señalización de la apertura y cierre de los estomas como respuesta a la falta de agua, por lo cual esta reacción afecta negativamente el crecimiento vegetal, adicional a esto se han encontrado concentraciones importantes de ABA en las raíces durante los periodos de estrés hídrico y el crecimiento del meristemo apical de la raíz bajo estas condiciones. Este proceso está directamente involucrado con el complejo inhibidor de las ciclinas dependientes de kinasa (CDK), las cuales están involucradas en la regulación del ciclo celular, de esta manera el inhibidor (ABA) es el que regula la actividad de CDK en las raíces durante estas condiciones de estrés (Buchanan *et al.* 2015).

En el gen *Dreb2B* el polimorfismo fue más alto considerando solo la región codificante, por lo que para este se obtuvieron por lo menos 9 cambios mutacionales, la variación en la composición nucleotídica tuvo diferencias entre los individuos, y no se siguieron patrones para las especies, en el análisis de coordenadas principales los individuos estuvieron muy dispersos, aunque las distancias genéticas no fueron muy altas entre las poblaciones o grupos de especies teniendo como máxima 0.007 entre los grupos de *Phaseolus* silvestre, ya que a diferencia con *Phaseolus vulgaris* las distancias fueron mucho más altas 0.024 considerando la divergencia de la especie cultivada de *P. vulgaris*; este mismo comportamiento se observó en el análisis de diversidad de Neighbor-Joining y el análisis de máxima verosimilitud, figura 16, 17 y 18.

En este mismo gen la inserción de un codón fue encontrado en individuos de *Phaseolus acutifolius* y de *Phaseolus parvifolius*, en este último con mayor número de individuos que presentaron dicho evento, por lo que se sugiere que esa característica puede estar relacionada con un carácter ancestral de la especie relacionada con una respuesta de este gen a una presión ambiental de tolerancia a sequia. Los genes *DREB* son factores de transcripción que inducen un juego de genes relacionados con estrés abiótico que ofrecen a las plantas tolerancia a factores abióticos, los genes *DREB* pertenecen a los factores de unión a elementos de respuesta a etileno, por sus siglas en ingles (ERF). *DREB2* está directamente involucrado en el gen de expresión de respuesta a estrés osmótico de la planta, en *Arabidopsis* este es el promotor del gen *RD29A/COR787LTI* contiene este elemento que actúa en cis relacionado con un gen de expresión inducible de estrés. *DRE* funciona en una vía independiente de ABA en respuesta a la sequia, alta salinidad y al estrés por frío. Los cADN codifican proteínas de unión *DRE*, *DREB1/ CBF*, Y *DREB2*, estas proteínas contienen un dominio de unión conservado encontrado en proteínas ERF y AP2. Estas se unen a la secuencia *DRE* y activa la expresión

de genes manejados por esta secuencia. Entre las proteínas tipo *DREB2*, las *DREB2A* y *DREB2B* son categorizados como los mejores factores de transcripción que funcionan bajo condiciones de estrés por sequía o alta salinidad (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki 2009).

Los individuos de la especie *Phaseolus acutifolius* evaluados en este estudio, pertenecen a regiones semiáridas y áridas por lo tanto son considerados muy tolerantes, ya que fisiológicamente pueden regular el metabolismo cuando están expuestos a este tipo de estrés, por ello es importante la evaluación no solo de genes responsables de la respuesta si no también factores de transcripción involucrados en la activación de estos genes. Se considera que este gen no solo es un activador de respuesta si no que actúa como un punto terminal de la señal del estrés en este proceso de señalización (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki 2009). Es importante conocer sobre la diversidad nucleotídica y haplotípica en los genes ya que puede estar relacionada con selección adaptativa y mayor posibilidad de respuesta a estrés ambiental, por esto se relaciona la diversidad encontrada entre las especies de *Phaseolus acutifolius* silvestre, la especie *Phaseolus parvifolius* y las variedades cultivadas, en regiones codificantes, ya que puede contribuir al entendimiento de las respuestas que tienen estas plantas y ser utilizadas de referencia para mejoramiento en los cultivos cercanos como frijol común y que son susceptibles en este caso al estrés por sequía.

El gen *ERECTA* como se ha mencionado, en las especies del género *Phaseolus*, fue bastante conservado donde en todos los individuos se encontró un solo cambio mutacional en la misma posición para *Phaseolus acutifolius* silvestre y cultivado, *Phaseolus acutifolius* var. *tenuifolius* y *Phaseolus parvifolius* con respecto a frijol común, lo cual indica puede ser distintivo de la cualidad silvestre de *P. acutifolius* y *P. parvifolius*, esto se refleja en la baja diversidad nucleotídica y en los pocos haplotipos obtenidos. Como se observa en la red haplotípica, este gen se considera muy conservado ya que el haplotipo común se encuentra en un rango geográfico muy grande, donde hay un individuo de Sudáfrica, individuos de EEUU, y varias regiones de México. Esto se demuestra la poca diversidad observada en el análisis de coordenadas principales y el análisis de diversidad de Neighbor-Joining, así como el agrupamiento en el análisis de máxima verosimilitud. Este gen ha sido estudiado en algunas especies de plantas y ha sido denominado quinasa putativa parecida a receptores repetidos ricos en leucina o (LRR-RLK) por sus siglas en inglés, tiene la función de regular la eficiencia en la transpiración, y también se ha demostrado que este gen actúa en el control del órgano de crecimiento y desarrollo floral, promoviendo la proliferación celular y también en el uso eficiente

del agua, estos evaluados en ensayos utilizando mutantes de la planta *Arabidopsis thaliana* (Roorkiwal *et al.* 2014).

Es importante resaltar que es el primer reporte de estos tres genes en la especie *Phaseolus acutifolius* y la especie hermana *Phaseolus parvifolius*, por lo tanto se validan para estas especies la presencia de los tres genes candidatos y por lo tanto las respuestas fisiológicas diferenciales de estos genes en respuesta a la sequia.

En los tres genes no fue posible hacer una clara diferenciación entre las especies *Phaseolus acutifolius* silvestre y *Phaseolus acutifolius* var. *tenuifolius* ya que comparten los mismos haplotipos para los tres genes. Evidenciar la presencia de los tres genes en plantas que natural y adaptativamente responden a ambientes con déficit hídrico comprueba la existencia de un complejo que incorpora muchas estrategias y mecanismos para una característica particular, en este caso hay tres genes que posiblemente hacen parte de ese complejo de respuesta.

3. Conclusiones y Recomendaciones

3.1. Conclusiones

Los tres genes candidatos *ASR2*, *DREB2B* y *ERECTA* estuvieron presentes en las especies de *Phaseolus acutifolius* y *Phaseolus parvifolius*, soportando la posible relación de un complejo de respuesta adaptativa a la sequía.

La baja variabilidad en las regiones codificantes de los genes indica la funcionalidad crítica que puede tener la proteína asociada al mecanismo de defensa de la especie para resistir en ambientes con déficit hídrico.

La similaridad de las especies *Phaseolus acutifolius* y *Phaseolus parvifolius* podrían indicar el carácter ancestral que comparten y su respuesta adaptativa a los ambientes de crecimiento de las especies.

El estudio de esta especie adaptada a la sequía, puede ser una estrategia para disminuir las pérdidas agronómicas de los cultivos de frijol y de esta forma mejorarlo en las regiones donde es cultivado, ya que considerando los cambios ambientales actuales, debido a los efectos del cambio climático, y que por lo tanto debe afrontar la frontera agrícola, para la seguridad alimentaria.

3.2. Recomendaciones

Considerando los resultados obtenidos de la presencia de los tres genes candidatos de tolerancia a sequía, en especies de *P. acutifolius*, sería importante evaluar los materiales en campo, realizando una fenotipificación para comparar los resultados del presente trabajo a nivel de expresión, de estos genes y tener mayor conocimiento de los materiales que tienen una respuesta más eficiente.

Se recomienda la evaluación de estos genes de la colección completa de germoplasma de *P. acutifolius*, para obtener información precisa de todos los materiales de la especie, como fuente de recursos genéticos y esta información pueda ser utilizada en programas de mejoramiento.

A. Anexos

Figura 29. Evaluación de la presencia del gen ASR2

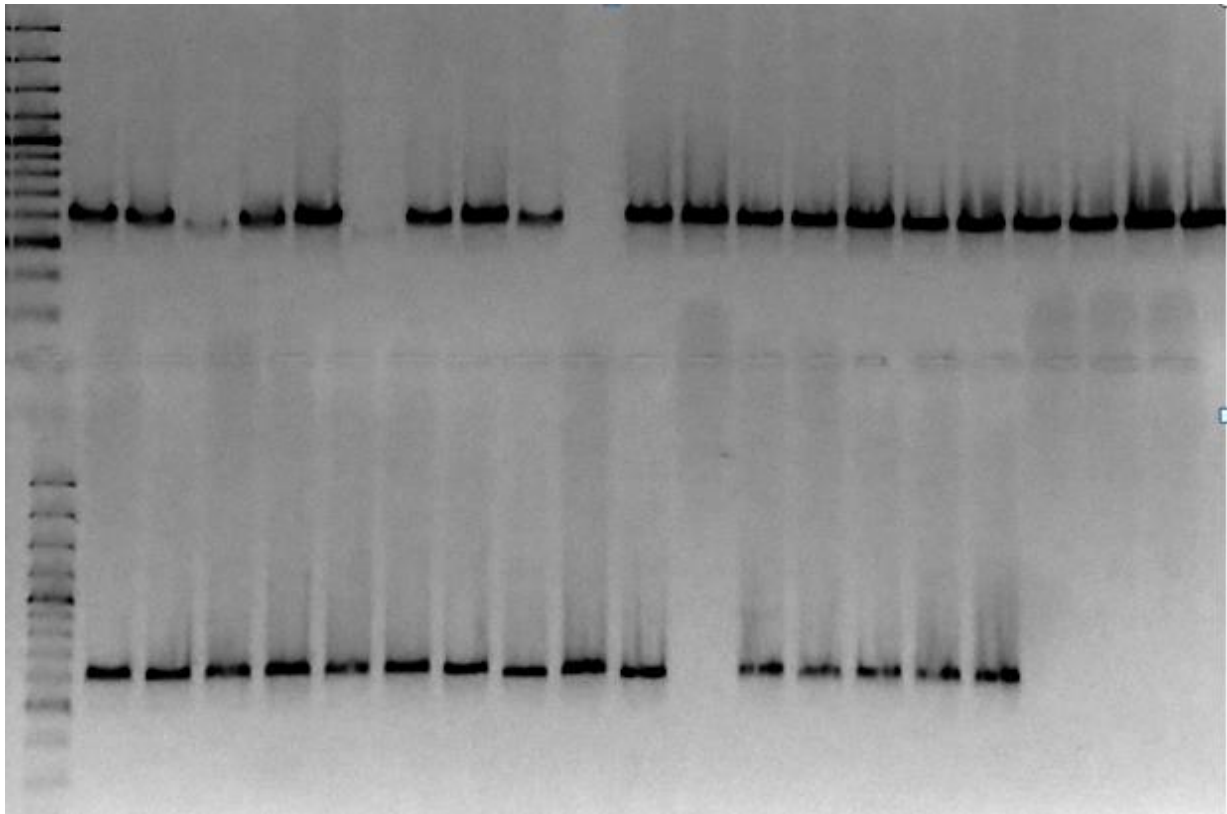


Figura 30. Evaluación de la presencia del gen Dreb2B

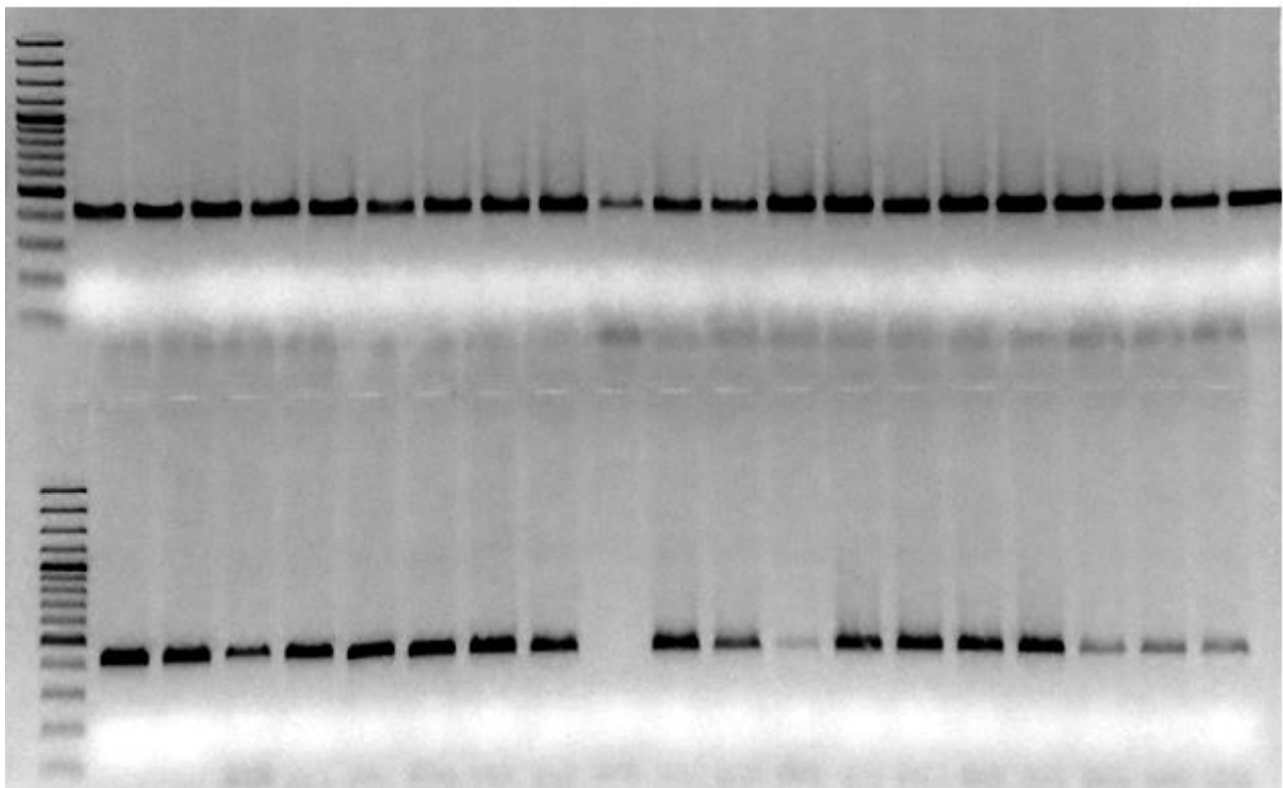


Figura 31. Evaluación de la presencia del Gen ERECTA

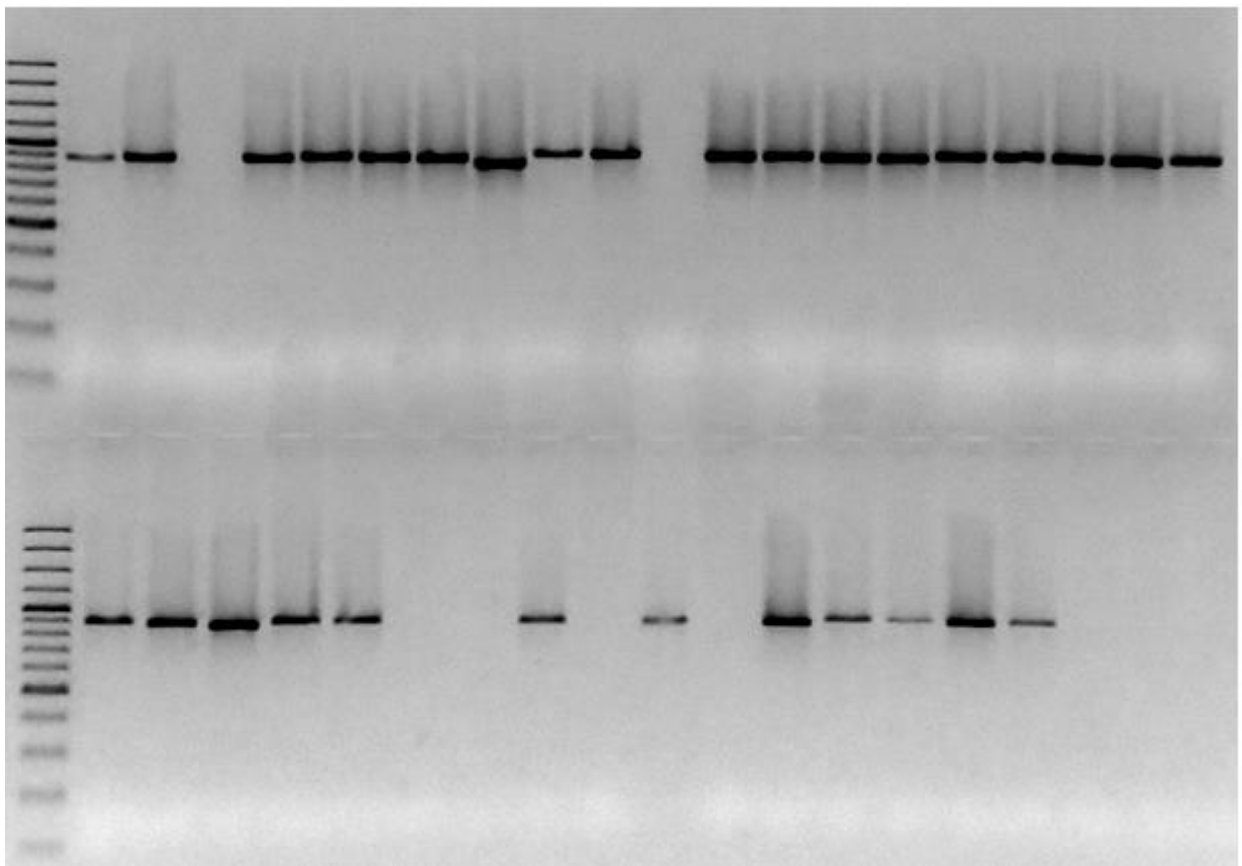


Figura 32. Lista de Genotipos Evaluados

Consecutivo	Origen	Genotipo	Especie
1	cultivados acuti	G40001	P.acutifolius
6	cultivados acuti	G40006	P.acutifolius
26	cultivados acuti	G40020	P.acutifolius
39	cultivados acuti	G40034	P.acutifolius
40	cultivados acuti	G40035	P.acutifolius
41	cultivados acuti	G40036	P.acutifolius
51	sillvestre acut	G40045	P.acutifolius
53	sillvestre acut	G40045	P.acutifolius
58	sillvestre acut	G40052	P.acutifolius
61	sillvestre acut	G40055	P.acutifolius
62	sillvestre acut	G40056	P.acutifolius
86	sillvestre acut	G40079	P.acutifolius
87	sillvestre acut	G40080	P.acutifolius
89	sillvestre acut	G40082	P.acutifolius
96	sillvestre acut	G40089	P.acutifolius
128	sillvestre acut	G40121	P.acutifolius
176	sillvestre acut	G40168	P.acutifolius
177	sillvestre acut	G40169	P.acutifolius
267	sillvestre acut	G40236	P.acutifolius
274	sillvestre acut	G40242	P.acutifolius
276	sillvestre acut	G40244	P.acutifolius
281	sillvestre acut	G40248A	P.acutifolius
110	sillvestre acut	G40103	P.acutifolius
114	sillvestre acut	G40107	P.acutifolius
224	sillvestre acut	G40196	P.acutifolius
226	sillvestre acut	G40198	P.acutifolius
230	sillvestre acut	G40203	P.acutifolius
213	sillvestre acut	G40187	P.acutifolius
214	sillvestre acut	G40188	P.acutifolius
320	Tenuifolius	G40286	P.acutifolius
271	Tenuifolius	G40239	P.acutifolius
282	Tenuifolius	G40249	P.acutifolius
286	Tenuifolius	G40253	P.acutifolius
299	parvifolius	G40264	P.parvifolius
301	parvifolius	G40266	P.parvifolius
109	parvifolius	G40102	P.parivifolius
116	parvifolius	G40109	P.parvifolius
175	parvifolius	G40167	P.parivifolius

178	parvifolius	G40170	P.parvifolius
207	parvifolius	G40181A	P.parvifolius
208	parvifolius	G40182	P.parvifolius
209	parvifolius	G40183	P.parvifolius
210	parvifolius	G40184	P.parvifolius
211	parvifolius	G40185	P.parvifolius
212	parvifolius	G40186	P.parvifolius
220	parvifolius	G40195	P.parvifolius
272	parvifolius	G40240	P.parvifolius
273	parvifolius	G40241	P.parvifolius
302	parvifolius	G40267	P.parvifolius
303	parvifolius	G40268	P.parvifolius
326	parvifolius	G40292	P.parvifolius
327	parvifolius	G40293	P.parvifolius

Bibliografía

- Addinsoft, 1993. Xlstat. Statistical Analysis in Excell. Addinsoft free trial version. All rights reserved. *Berkley California*.
- Bartels, D. & Sunkar, R., 2005. Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical reviews in plant sciences*, pp.23–58.
- Beebe, S. et al., 2011. Chapter 16 Genetic Improvement of Common Beans and the Challenges of Climate Change. In *Challenges*. pp. 356–369.
- Beebe, S., 2012. Common bean breeding in the tropics. *Plant Breeding Reviews volume 36*, 36, pp.357–426.
- Beebe, S. et al., 2013. Phenotyping common beans for adaptation to drought. *Frotiers in Physiology*, 4, pp.1–20.
- Blair, M., Cortés, A. & Dominique, T., 2016. Identification of an ERECTA gene and its drought adaptation associations with wild and cultivated common bean. *Plant Science*, 242, pp.250–259. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.08.004>.
- Blair, M., Pantoja, W. & Muñoz, C., 2012. First use of microsatellite markers in a large collection of cultivated and wild accessions of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). *Theoretical and Applied Genetics*, 125(6), pp.1137–1147.
- Broughton, W.J. et al., 2003. Beans (*Phaseolus* spp .) – model food legumes. , pp.55–128.
- Buchanan, B., Grisse, W. & Jones, R., 2015. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* second. B. . Buchanan, W. Grisse, & R. Jones, eds., Oxford.
- Collard, B.C.Y. et al., 2005. An introduction to markers , quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement : The basic concepts. , pp.169–196.
- Cortés, A. et al., 2012. Molecular ecology and selection in the drought-related Asr gene polymorphisms in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genetics*, 13(1), p.58.
- Cortés, J. et al., 2012. Nucleotide diversity patterns at the drought-related DREB2 encoding genes in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris* L .). *Theoretical and Applied Genetics*, pp.1069–1085.
- Debouck, D.G., 1999. Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean. *Common Bean Improvement in the Twenty-First Century*, pp.25–52.
- Dellaporta, S., 1994. Urea-based Plant DNA Miniprep. In *The Maize Handbook*. New York, p. 776. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4612-2694-9>.

- Farooq, M. et al., 2009. Plant drought stress : effects , mechanisms and management To cite this version : Review article. *Agronomy for Sustainable Development, Springer Verlag (Germany)*, 29(1), pp.185–212.
- Fluxus-engineering, 2015. Fluxus-engineering.com version date 24 december 2015. *Copyright, Fluxus Tec.*
- Frankel, N. et al., 2006. Evolutionary history of the Asr gene family. *Gene*, 378(1-2), pp.74–83.
- Garvin, D.F. & Weeden, N.F., 1994. Isozyme evidence supporting a single geographic origin for domesticated tepary bean. *Crop Science*, 34(5), pp.1390–1395.
- Gaut, B. et al., 2011. The Patterns and Causes of Variation in Plant Nucleotide Substitution Rates. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst*, 42, pp.245–66. Available at: www.annualreviews.org.
- Gepts, P. et al., 2005. Legumes as a Model Plant Family . *Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference 1.* , 137(April), pp.1228–1235.
- Gujaria-Verma, N. et al., 2016. Gene-based SNP discovery in tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) and common bean (*P. vulgaris*) for diversity analysis and comparative mapping. *BMC Genomics*, 17, p.239.
- Gupta, S. & Nadarajan, N., 2014. Legumes in the Omic Era: retronpects and prospects. In S. Debjyoti, ed. *Legumes in the Omic Era*. New York, pp. 131–153. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-8370-0>.
- Hall, T.A., 1999. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.
- Kearse, M. et al., 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12).
- Kordrostami, M. & Rahimi, M., 2015. Molecular Markers in Plants: Concepts and Applications. *Genetics in the 3rd Millenium*, 13(2), pp.4022–4029.
- Kumar, P. et al., 2009. Southern Cross Journals © 2009 Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. , 2(4), pp.141–162.
- Kwon, J.M. & Goate, A.M., 2000. The Candidate Gene Approach. *Alcohol Research & Health*, 24(3), p.5.
- Liu, Q. et al., 1998. Two Transcription Factors , DREB1 and DREB2 , with an EREBP / AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low- Temperature-Responsive Gene Expression , Respectively , in *Arabidopsis*. , 10(August), pp.1391–1406.

- Long, M., 2002. Protein-coding Segments : Evolution of Exon – Intron Gene Structure. *Encyclopedia of Life Science*.
- Maskin, L. et al., 2001. Differential expression of the members of the. *Plant Science*, 161, pp.739– 746.
- Muñoz, L.C. et al., 2004. Introgression in common bean x tepary bean interspecific congruity-backcross lines as measured by AFLP markers. *Crop Science*, 44(2), pp.637–645.
- Muñoz, L.C. et al., 2006. Taxonomy of tepary bean and wild relatives as determined by amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Crop Science*, 46(4), pp.1744–1754.
- Nei, M., 2005. Selectionism and Neutralism in Molecular Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 22(12), pp.2318–2342.
- Pace, C. De et al., 2013. Identification of Traits , Genes , and Crops of the Future.
- Pachauri, R. et al., 2007. Climate Change 2007. In *Synthesis Report*. pp. 1–8.
- Peakall, R. & Smouse, P., 2012. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28, pp.2537–2539.
- Perrier, X., Flori, A. & Bonnot, F., 2003. Data analysis methods. In: Hamon, P., Seguin, M., Perrier, X., Glaszmann, J. C. Ed., Genetic diversity of cultivated tropical plants. *Enfield, Science Publishers. Montpellier*, pp.43 – 76.
- Pratt, R.C. & Nabhan, G.P., 1988a. Evolution And Diversity of Phaseolus acutifolius Genetic Resources. In P. Gepts, ed. pp. 409– 433.
- Pratt, R.C. & Nabhan, G.P., 1988b. Evolution and Diversity of Phaseolus acutifolius Genetic Resources biblio. In P. Gepts, ed. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. p. 596.
- Rao, I. et al., 2013. CAN TEPARY BEAN BE A MODEL FOR IMPROVEMENT OF DROUGHT RESISTANCE. *Crop, African Society, Science*, 21(4), pp.265–281.
- Roorkiwal, M. et al., 2014. Allele diversity for abiotic stress responsive candidate genes in chickpea reference set using gene based SNP markers. *Frontiers in Plant Science*, 5(June), pp.1–11. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00248/abstract>.
- Rozas, J. & Rozas, R., 1995. DNAsp, DNA sequence polymorphism: an interactive program for estimating Population Genetics parameters from DNA sequence data. *Comput. Applic. Biosci.*, 11, pp.621–625.
- Schmitz, A. & Riesner, D., 2006. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical Biochemistry*, 354(2), pp.311 – 313.

- Schmutz, J. et al., 2014. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature genetics*, 46(7).
- Stephens, J.M., 2015. Bean, Tepary Phaseolus acutifolius A. Gray. , (August), pp.1–2.
- Strandberg, A.K.K. & Salter, L.A., 2004. A comparison of methods for estimating the transition:transversion ratio from DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(2), pp.495–503.
- Tamura, K. et al., 2007. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*.
- Urrea, C., Miklas, P. & James, B., 1999. Inheritance of resistance to common bacterial blight in common bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(1), pp.24–27.
- Varshney, R.K. et al., 2010. More genomic resources for less-studied crops. *Trends in Biotechnology*, 28(9), pp.452–460. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.06.007>.
- Varshney, R.K. & Kudapa, H., 2013. Legume biology: The basis for crop improvement. *Functional Plant Biology*, 40(12).
- Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K., 2009. DREB Regulons in Abiotic-Stress-Responsive Gene Expression in Plants. In *Molecular Breeding of Forage and Turf*. New York, NY: Springer New York, pp. 15–28. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-79144-9_2.