

Informe final* del Proyecto WN007
Genómica Funcional en Frijoles Mexicanos, Primera Etapa*

Responsable: Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles
Institución: Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Biotecnología
Dirección: Av. Universidad # 2001, Chamilpa, Cuernavaca, Mor, 62260 , México.
Fecha de inicio: Agosto 15, 2016.
Fecha de término: Marzo 5, 2020.
Principales resultados: Informe final.
Forma de citar el informe final y otros resultados:** Covarrubias Robles A. 2021. Genómica Funcional en Frijoles Mexicanos, Primera Etapa. UNAM. Instituto de Biotecnología. **Informe final SNIB-CONABIO, proyecto No. WN007.** Ciudad de México.

Resumen:

Identificación de genotipos contrastantes, genes y procesos implicados en la adaptación a sequía terminal en *Phaseolus vulgaris*.

-
- * El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx
 - ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

Informe Final-Primera Etapa.

Proyecto: GENÓMICA FUNCIONAL EN FRIJOLES MEXICANOS

Responsable: Dra. Alejandra A. Covarrubias Robles

Febrero 2020

Introducción

En la dieta mundial, el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) figura entre las leguminosas más consumidas. El 60% del mismo es cultivado en seco, por lo que períodos inesperados e intermitentes de sequía generan pérdidas de hasta 80% en el rendimiento del cultivo (Acosta y Kohashi, 1989; FAO, 2011). Por ello, la búsqueda de cultivares resistentes a la sequía ha sido una de las estrategias seguidas para lidiar con ambientes adversos (Polania et al., 2016).

En América Latina se produce aproximadamente la mitad de la producción mundial anual del grano (Beebe et al., 2013). En México, el frijol constituye el tercer cultivo en importancia por la superficie de tierras agrícolas que se destinan a la siembra del mismo, además de presentar, particularmente en nuestro país, un gran acervo genético del género *Phaseolus*. Sin embargo, el 70% de este milenar cultivo en tierras mexicanas es afectado por la sequía terminal (Acosta y Kohashi, 1989).

La carencia de agua en cualquier punto del ciclo de vida de las plantas influye en el crecimiento y desarrollo de las mismas. Sin embargo, la sequía terminal, que consiste en la ocurrencia de estrés hídrico durante las fases tempranas del desarrollo reproductivo y llenado del grano, provoca consecuencias devastadoras. Este tipo de sequía causa el aborto de los embriones, disminución en la acumulación de biomasa en los órganos de almacenamiento, y cambios en la relación entre el contenido de carbono en los órganos fotosintéticos (hojas, que son la fuente) y órganos heterotróficos (semillas y raíces, que son el sumidero) (Boyer y Westgate, 2004; Polania et al., 2016).

Muchos de los cultivares de frijol resistentes a sequía distribuidos en el mundo han sido seleccionados para soportar la sequía terminal y, aunque se conocen algunas de las características fisiológicas de este cultivo relacionadas a este carácter agronómico, a la fecha no se han estudiado con el detalle necesario los procesos y los genes relacionados a esta característica particular. Con el fin de entender mejor las estrategias que utilizan diferentes variedades de frijol para sobrepasar el daño ejercido por una sequía terminal, en este proyecto se lleva a cabo un análisis genómico-funcional con cultivares de frijol que han sido caracterizado agronómicamente y con valor comercial. Se espera que la identificación de procesos relevantes para esta respuesta y de los genes asociados amplíe la utilización de los recursos genéticos para el mejoramiento de este cultivo.

Objetivo general del proyecto

Identificar genotipos contrastantes, genes y procesos implicados en la adaptación a sequía terminal en *Phaseolus vulgaris*.

Objetivos particulares

- Verificar y/o determinar la resistencia a sequía terminal de los cultivares de frijol y de las variedades nativas seleccionadas para este estudio bajo condiciones de invernadero.
- Realizar cruces entre las variedades que muestren los fenotipos más contrastantes con el fin de analizar, en una primera etapa, individuos de la progenie.
- Obtener RNA total de hojas, semillas, testas y vainas a partir de plantas de variedades de frijol cuyas características de resistencia a sequía resulten contrastantes (que fungirán como padres en las cruces), crecidas bajo condiciones de estrés o bajo irrigación óptima, para realizar un análisis transcriptómico (RNAseq).
- Obtener muestras a partir de las mismas variedades y de los mismos órganos y condiciones indicadas arriba que serían sometidas a un análisis metabolómico para obtener patrones metabólicos que se tratarían de relacionar con la respuesta al estrés y a sus características genéticas, a través de la información de la secuencia de los genomas de los cultivares bajo estudio, la cual también se obtendrá.

Cumplimiento de los objetivos

Como se reportó en el informe anterior, este proyecto se enfrentó a serios problemas por las condiciones de los invernaderos y la deficiencia en su mantenimiento por parte de nuestro instituto; sin embargo, el apoyo proporcionado por CONABIO, contribuyó a sobrepasar esta problemática y lograr cumplir con la gran mayoría de los objetivos planteados.

Avances obtenidos

En seguida se presenta un resumen de los datos obtenidos a lo largo de este proyecto-

- Los cultivar Pinto Saltillo (PS) y Bayo Madero (BM) ya se han sido evaluados a nivel agronómico. El cultivar Pinto Saltillo se considera resistente a sequía terminal (PS^R), en tanto que el cultivar Bayo Madero se considera sensible (BM^S). Bajo las condiciones establecidas en las facilidades de invernadero disponibles, los datos obtenidos mostraron el patrón morfo-fisiológico y el rendimiento esperado en ambos cultivares durante el tratamiento por sequía terminal.

- El cultivar PS^R presentó mayores índices de distribución de biomasa hacia los órganos sumideros bajo condiciones de sequía terminal que el cultivar BM^S, considerando a la planta completa. También se evidenció una mayor biomasa en las vainas y semillas del continuo 'hoja fuente-vaina-semilla', indicando y confirmando una mayor translocación de carbohidratos a los órganos sumideros.

- PS^R en condiciones de sequía terminal severa no presenta diferencias con BM^S en parámetros determinados en las hojas como potencial osmótico, eficiencia fotosíntesis, conductancia estomática, concentración interna de CO₂ y transpiración, indicando que, a pesar de que una fotosíntesis más eficiente, o un mejor balance entre la apertura y cerrado estomático en las hojas permitiría una mayor disponibilidad de carbono, la estrategia de resistencia no está dirigida a modificar notablemente las funciones esenciales en las hojas bajo estas condiciones.

- Estas observaciones plantearon la evaluación de los mismos parámetros fisiológicos en los órganos reproductivos (el fruto: la vaina y la semilla); ya que, se mostró una mayor producción de vainas y una mayor distribución de biomasa hacia las vainas en PS^R. La determinación de parámetros fotosintéticos demostraron que las vainas son incapaces de realizar fotosíntesis por toma del CO₂ del aire, ya que los valores de fotosíntesis en este órgano son nulos y, además, encontramos que los estomas en la etapa intermedia del llenado del grano se encuentran totalmente ocluidos por cera. Sin embargo, los valores de los niveles de clorofila son altos en las vainas, más en las de PS^R que en las de BM^S; es un hecho, las vainas están verdes en esta fase.

- La obtención del RNA para el análisis transcriptómico se llevó a cabo a partir de hojas fuente, de las valvas de las vainas, y de semillas, que a su vez se obtuvieron de las mismas plantas de donde se realizaron las medidas fisiológicas, de tal manera que esto nos permite correlacionar los procesos fisiológicos con los moleculares, a nivel de transcritos. Estos experimentos plantearon un reto en su momento debido a que la calidad del RNA obtenido no reunía los niveles necesarios para la secuenciación masiva de los RNAs mensajeros. Por ello, Ingrid y Alexis decidieron establecer condiciones específicas para la obtención de las muestras de RNA de estos órganos, particularmente, valvas y semillas. Afortunadamente lograron establecer un mejor método de purificación de RNA a partir de estos órganos, lo que también llevó a la publicación de este protocolo en una revista de difusión internacional.

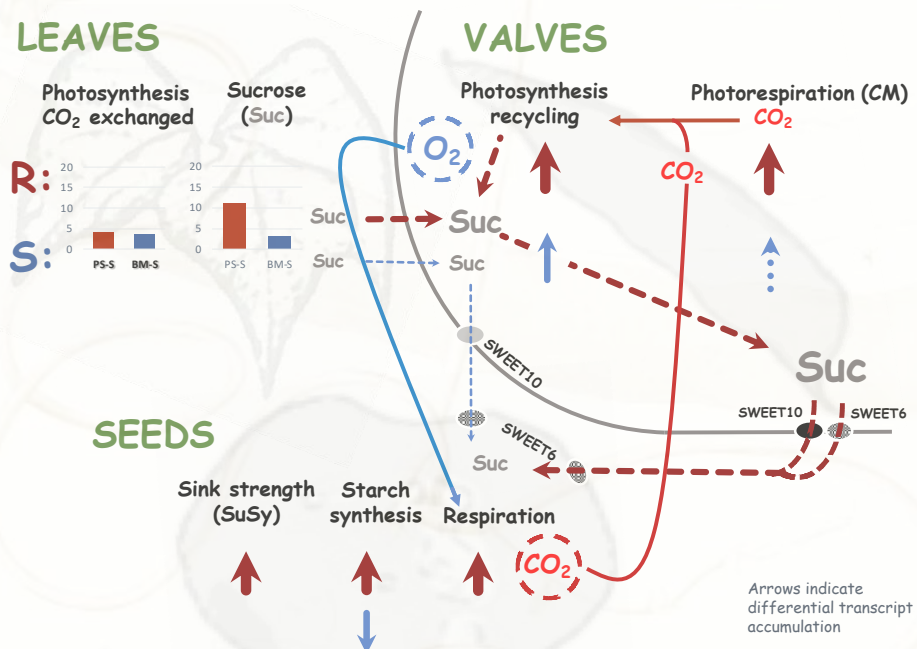
- Se obtuvo RNA con la calidad necesaria para su secuenciación a partir de hojas fuente, valvas y semillas, durante la fase de llenado intermedio del grano, de plantas de PS^R y BM^S, crecidas en condiciones óptimas o bajo tratamiento de sequía terminal, con tres repeticiones cada una, para un total de 36 muestras. Entonces se prepararon 36 bibliotecas a partir de

RNA total y se generaron, aproximadamente, de 20 a 25 millones de lecturas sencillas (1x75) por muestra.

- El análisis de los datos obtenidos de la secuenciación masiva fue un proceso relativamente largo, en el que se aplicaron diferentes tipos de evaluación; así como, de una amplia revisión bibliográfica. Este análisis exhaustivo dio como resultado un panorama realmente fascinante sobre las estrategias metabólicas de ajuste que se llevan a cabo en el frijol para lograr una buena productividad/rendimiento bajo condiciones de sequía terminal. En una primera fase nos enfocamos en la comparación entre los niveles de los transcritos obtenidos de condiciones control contra sequía terminal en el mismo cultivar. La información más relevante obtenida mostró, por un lado, que los niveles de los transcritos relacionados con las funciones fotosintéticas en las hojas fuente no revelaron diferencias en ninguno de los dos cultivares entre condiciones control y de estrés; lo cual es consistente con los datos fisiológicos obtenidos que tampoco mostraron diferencias en este tipo de comparación. Sin embargo, la determinación de los niveles de azúcares en estos órganos reveló que la concentración de sacarosa es mayor en hojas de PS^R que de BM^S. Esto indica que en las hojas de este cultivar se encuentra activa una ruta metabólica que permite la acumulación de sacarosa sin la necesidad de tener una fotosíntesis más activa. Por otro lado, el análisis de los datos obtenidos a partir de las valvas mostraron una mayor acumulación en estrés que en condiciones óptimas en los transcritos relacionados con las fase luminosa y de fijación de carbono de la fotosíntesis en las valvas de PS^R comparadas con las de BM^S. Nuevamente, de acuerdo a los datos fisiológicos que mostraron una mayor acumulación de clorofila en las valvas de PS^R bajo estrés contra condiciones óptimas, que en las de BM^S comparando las mismas condiciones. Sin embargo, estas observaciones trajeron consigo una paradoja; ya que al estar los estomas sellados por cera en las valvas en la etapa de desarrollo examinada, cómo es posible tener una fotosíntesis funcional. La paradoja se resolvió al percatarnos que transcritos relacionados con la fotorrespiración y con mecanismos de concentración de CO₂ mostraron mayores niveles en estrés que en control en PS^R que los exhibidos por BM^S. Esto nos llevó a proponer que los tejidos de las valvas de PS obtienen el CO₂ necesario para completar el ciclo de fijación de carbono a partir del que se produce por el proceso de fotorrespiración y de vías implicadas en la concentración de CO₂. Esta interpretación se complementa con el hecho de que los transcritos relacionados con la respiración en la semilla también muestran mayores diferencias en PS que en BM, de donde se podría inferir que este proceso al liberar CO₂, éste podría difundir hacia las valvas y fijarse a esqueltos carbonados por la Rubisco en ese órgano. En tanto que la respiración que ocurre en el embrión y que requiere como sustrato al O₂, éste podría provenir del proceso fotosintético que ocurre en las valvas, el cual difundiría hacia la semilla, completando de esta manera un ciclo de cooperación entre la vaina y la semilla para aprovechar eficientemente el CO₂ que alcanza a llegar a estos órganos en estas condiciones. Cabe destacar que en la semilla

también se detectaron mayores niveles de transcritos implicados en la síntesis de almidón y en la degradación de sacarosa (Sacarosa sintasa) en PS, en condiciones de estrés comparado con condiciones control, que en BM tras la misma comparación, ambos metabolismos necesarios para el llenado del grano. También es interesante hacer notar que se detectaron diferencias en la acumulación de transcritos que codifican para transportadores pasivos de la sacarosa (SWEET), en concordancia con la diferencia de concentraciones de sacarosa entre la hoja fuente y la semilla que, como se mencionó arriba, en la hoja fuente hay mayores diferencias en los niveles de sacarosa en PS en sequía en comparación con control, que en BM; en tanto que, en la semilla los niveles de sacarosa son menores de acuerdo con los altos niveles de transcritos que codifican para la sacarosa sintasa, una de las enzimas más eficientes en la degradación de sacarosa. De esta manera se genera un gradiente en la concentración de sacarosa que favorecería su transporte de las hojas fuente a las semillas.

- Las evidencias encontradas en este estudio permiten proponer que el mecanismo que se privilegia en las plantas de frijol resistentes a sequía terminal, capaces de producir más vainas y semillas en esta condición adversa respecto a otras plantas pertenecientes a cultivares considerados sensibles, es la fotosíntesis de reciclaje de CO₂, en coordinación con mecanismos de concentración de CO₂, en las valvas, acoplado éstos con la generación de una elevada fuerza de vertedero en la semilla, lo que promueve una eficiente translocación de sacarosa de las hojas a las valvas y de ahí a la semilla (Ver figura 1).



- Estos datos se complementarán con los que se generen de experimentos adicionales, algunos de los cuales ya se están realizando, que nos darán más información sobre estos mecanismos de resistencia a sequía terminal en frijol, y muy probablemente en otras leguminosas y, a su vez, con una alta probabilidad de generar más publicaciones.

Metodología utilizada para el análisis informático de los transcriptomas obtenidos.

Se obtuvieron un total de 36 transcriptomas de hojas, semillas y vainas a partir de plantas sometidas a sequía terminal o crecidas bajo condiciones óptimas. La secuencia de los RNAs mensajeros se obtuvo a partir de bibliotecas de su DNA complementario (cDNA), utilizando Illumina Truseq single-end 1x75. La calidad de las lecturas secuenciadas se analizó por FASTQC. Las lecturas de baja calidad (QC<20) se filtraron mediante el programa TRIMMOMATIC, el cual permitió remover secuencias sobre-representadas en las bibliotecas. Después del filtrado, se procedió a asignar las lecturas al transcriptoma de *P. vulgaris* descargado de la base de datos depositada en *Phytozome* (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Pvulgaris), el cual se utilizó como referencia para todos los transcriptomas. Para el análisis de expresión diferencial, se procedió a utilizar el paquete edgeR de R. Así también se utilizó el paquete topGO de R para el análisis de enriquecimiento de categorías del GO (Gene Ontology). También se usó el programa en línea REVIGO (<http://revigo.irb.hr>) para la eliminación de la redundancia en la categorías funcionales enriquecidas.

Análisis de los transcriptomas de *P. saltillo* y *B. madero* en condiciones de estrés

1.- El programa FASTQC fue utilizado para revisar la calidad de las lecturas secuenciadas por Illumina Truseq single end 1x75, con los parametros default

```
fastqc *.fastq.gz -o ./RESFASTQC
```

2.- Se encontró una librería de semillas con alto porcentaje de secuencias sobrerrepresentadas, por lo que se procedió a filtrar las lecturas de baja calidad y aquellas secuencias sobrerrepresentadas de todas las librerías mediante TRIMMOMATIC con los siguientes parámetros

```
java -jar $TRIMMOMATIC SE -threads 4 BMVC1.fastq.gz ./TrimmData/BMVC1.trimmm.fastq.gz ILLUMINACLIP:Lote1_BM.fasta:2:30:10 MAXINFO:50:0.6 LEADING:20 TRAILING:20 MINLEN:40
```

Después del filtrado se analizó nuevamente con FASTQC para observar de nuevo la calidad de las lecturas.

3.- Mediante el pseudomapeador KALLISTO se procedió a asignar las lecturas a los transcritos del genoma de *P. vulgaris* descargado de phytozome.

```
kallisto quant --single -l 75 -s 20 -t 2 --bias -i ../IndexFrijol/PvulTIndexKall.idx -o ./MAPKall/BMVC1 ./TrimmData/BMVC1.trimmm.fastq.gz
```

4.- Una vez asignadas las lecturas a los transcritos, se creó una tabla de cuentas de lecturas por transcrito. Esta tabla fue utilizada en R para realizar el análisis de expresión diferencial genica con el paquete EDGER de R, la cual hace uso de otros paquetes como LIMMA y PHEATMAP. El script para el análisis de los datos fue similar para hoja, semilla y vaina.

```
library(limma)
library(edgeR)
getwd()
setwd(outputpathcount)
counts = read.table("PvulgEstres.txt", header=TRUE, row.names=1)
```



```
#####
####
# Para remover aquellos datos con valores menores de 1 de la tabla genera
da con los datos de Kallisto
counts[ (counts<1) ] = 0 # remover counts con valores menores de 1 y asig
narle 0
summary(counts)

#####
####
sum(counts[,c(19)]) # Num de lecturas en la biblioteca seleccionada
dim(counts) # num de columnas y de filas
counts = counts[rowSums(cpm(counts) > 2) >=5,] #Filtrando filas y columna
s
dim(counts) # Num de filas y columnas
colnames(counts)

#####
####
grpH = c("BMHC", "BMHC", "BMHE", "BMHE", "PSHC", "PSHC", "PSHE", "PSHE")
(dge.LEAVE = DGEList(dge.LEAVE[,c(1,3,5,6,8,9,11,12)], group=grpH)) # Gru
pos para Hoja
(dge.LEAVE = calcNormFactors(dge.LEAVE))

#####
# Graficando la dispersion de las bibliotecas de hojas
par(mai=c(1,1,0.5,0.5),cex.axis=2, mfrow= c(1,1))
plotMDS(dge.LEAVE,dim.plot=c(1,2), cex.lab=1.5,cex = 2,
        col=c(rep("blue",2),rep("green",2)))
abline(h=0, v=0, col = "green")
dev.off()

#####
# Dieño del experimento para hoja
# Creando la tabla que corresponde al experimento
(Cond = c(rep("CON",2), rep("DROU",2),rep("CON",2), rep("DROU",2)))
grupo2 = cbind(c(rep("BM",4), rep("PS",4)), Cond); grupo2
colnames(grupo2) = c("Especie", "grupo"); rownames(grupo2) = c(1:8)
(grupo2)

# Creando los factores de cada grupo
(gr = factor(paste(grupo2[,1], grupo2[,2], sep = ".")))

# Dise??o para los contrastes de comparacion
```

```

(design2 <- model.matrix(~0+gr))

# Calcular la dispersion tomando en cuenta el dise??o de los contrastes en
modo GLM
dge.LEAVE = estimateGLMCommonDisp(dge.LEAVE, design2, verbose = T)
dge.LEAVE = estimateGLMTrendedDisp(dge.LEAVE, design2 )
dge.LEAVE = estimateGLMTagwiseDisp(dge.LEAVE, design2)

#####
# Asignacion de los contrastes para hojas
(myContrast = makeContrasts(
  BM.Drou = grBM.DROU-grBM.CON, # 1 Aquellos DEG en respuesta al estres en
  PS.Drou = grPS.DROU-grPS.CON, # 2 Aquellos DEG en respuesta al estres en
  PSvsBM.DROU = grPS.DROU-grBM.DROU, # 3 Aquellos genes de PS con mayor o m
  PSvsBM.CON = grPS.CON-grBM.CON, # 4 Aquellos genes de PS con mayor o meno
  DROUvsCON = (grPS.DROU+grBM.DROU)/2-(grPS.CON+grBM.CON)/2, # 5 Aquellos g
  HOJA.DROU_PSvsBM = (grPS.DROU+grPS.CON)/2-(grBM.DROU+grBM.CON)/2,
  levels = design2))

#####
#####
##
# Tomando una prueba con mayor robustez
(design2)
dge.LEAVE$samples
(fit.LEAVE <- glmFit(dge.LEAVE,design =design2))
# Prueba de contrastes
(ConActual = colnames(myContrast)[3])
lrt.LEAVE <- glmLRT(fit.LEAVE, contrast = myContrast[,ConActual])
lrt.LEAVE$comparison
head(lrt.LEAVE$table)
topTags(lrt.LEAVE)
summary(de <- decideTestsDGE(lrt.LEAVE, lfc = 1, p.value = 0.01))
lrt.tab.LEAVE = topTags(lrt.LEAVE, n=Inf)$table
head(lrt.tab.LEAVE)

#####
#####
# Para los DEG se uso este metodo para filtrar los datos
# Sacando los datos con logFC y fdr
deGen1.LE = rownames(lrt.tab.LEAVE)[(lrt.tab.LEAVE$FDR < 0.05) & (abs(lrt
.tab.LEAVE$logFC) > 1)]; length(deGen1.LE)
updeGen1.LE <- rownames(lrt.tab.LEAVE)[(lrt.tab.LEAVE$FDR < 0.05) & (lrt.
tab.LEAVE$logFC > 1)]; length(updeGen1.LE)
downdeGen1.LE <- rownames(lrt.tab.LEAVE)[(lrt.tab.LEAVE$FDR < 0.05) & (lr

```

```

t.tab.LEAVE$logFC < -1)]; length(downdeGen1.LE)

#####
#####
# Grafica de los DEG para hojas
getwd()
par(mai=c(1.5,1.5,0.8,0.3), mfrow= c(1,2),cex=1.2, cex.lab=2, las=1, mgp=
c(4.4,1,0))
barplot(c(length(deGen1.LE), length(updeGen1.LE), length(downdeGen1.LE)),
col = c("gray", "green","red"), cex.axis = 2, cex.names = 2,
names.arg= c("Total", "UP", "DOWN"), ylab = "# Genes", main = lrt.L
text(0.7,y=length(deGen1.LE)*0.8, labels = length(deGen1.LE), cex = 2);
text(1.9,y=length(updeGen1.LE)*0.8, labels = length(updeGen1.LE), cex = 2
);
text(3.1,y=length(downdeGen1.LE)*0.8, labels = length(downdeGen1.LE), cex
= 2)
plotSmear(lrt.LEAVE, de.tags=deGen1.LE, main = c(ConActual,"FDR 0.05"), s
mooth.scatter = T, lowess = F, cex = 1,cex.axis = 2)
abline(h=c(-1, 1), lty = 2, col="blue")
dev.off()

#####
#####
# Para sacar los graficos de tablas coloridas de cuentas por millon
library(pheatmap)
(NameConActual = paste("HOJA/PSvsBM_Stress/HMP-LEAVE_3_DEG_",ConActual,"_
GLM.png", sep = ""))
HMPLeaves = pheatmap(cpm(LEAV2.2, normalized.lib.sizes = T, log = T)[deGe
n1.LE,c(3,4,7,8)],#PS.DrouVsBM.Drou
show_rownames = F, cex = 1, main = ConActual, border_c
annotation_row = CLUSTERS_Stress,annotation_colors = a
annotation_legend = T,angle_col = "45", #cutree_col =
labels_col = c(grpH[3:4],grpH[7:8]), # PS vs BM, Drou
cellwidth = 25, cellheight = 0.22, fontsize = 16, file
cutree_rows = 15, cluster_cols = F, #kmeans_k = 10, #b
color = colorRampPalette(c("black", "gray", "cyan", "red
dev.off()

# configuracion de los cluster
HMPLeaves$tree_row

# Re-ordenar los datos originales al orden de la tabla colorida de CPM
rownames(LEAV2.2[HMPLeaves$tree_row[["order"]],])

```

```
# Numero de cluster a obtener
CLUS_LEAVES = sort(cutree(HMPLeaves$tree_row, k=15))
length(CLUS_LEAVES[CLUS_LEAVES == 15])
CLUS_LEAVES[CLUS_LEAVES == 7]
which(CLUS_LEAVES == 7)

# Guardar todos los cluster asociados sus ID
write.table(CLUS_LEAVES, file = "HMPCLUS_PSVsBM_Drou.txt", sep = "\t", col
.names = "Cluster")
# Leer la tabla para usarla dentro del annotation_row
CLUSTERS_Stress= read.table(file = "PSvsBM_Stress/HMPCLUS_PSVsBM_Drou.txt
", header = T, sep = "\t", row.names = 1)
head(CLUSTERS_Stress)

ann_colors2 = list(
  Cluster = c("C1"="black", "C2"="orange", "C3"="gold", "C4"="yellow", "C5"
"C6"="blue", "C7"="pink", "C8"="red", "C9"="cyan", "C10"="gra
"C11"="#FF3300", "C12"="#660066", "C13"="#666600", "C14"="#9933F
```

Formación de recursos humanos.

En este proyecto se han formado y han contribuido las siguientes personas:

- Un alumno de licenciatura Luis Manuel Rojas Tovar asesorado por el Dr. Jorge Acosta (INIFAP, Campo Experimental Celaya, Guanajuato), quien participó en la realización de las cruzas entre loc cultivares de interés, particularmente, Pinto Saltillo y Bayo Madero y con análisis fisiológicos en campo. Este trabajo le permitió obtener el grado de licenciatura como Ingeniero en Agronomía del Instituto Tecnológico de Roque con la tesis titulada “Rendimiento del frijol del tipo Pinto y Flor de Mayo bajo riego y temperaturas altas naturales”.
- Una alumna de Doctorado, Ingrid González Lemes, asesorada por la Dra. Alejandra A. Covarrubias (Instituto de Biotecnología-UNAM, Cuernavaca), quien está cursando el sexto semestre del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas-UNAM. Su trabajo de tesis que se titula “Estudio sobre la translocación de azúcares a los órganos reproductivos y el metabolismo de carbono en la resistencia a sequía terminal en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)”, ha contribuido de forma muy importante al desarrollo de este proyecto.
- El Dr. José Cetz, asesorado directamente por el Dr. Alfredo Herrera Estrella (LANGEBIO-CINVESTAV, Irapuato), contribuyó con el análisis bioinformático de los datos de secuenciación masiva (RNAseq).
- El Dr. Alexis Acosta Maspons, quien con su experiencia y diligencia, ha sido clave en el diseño y desarrollo de los experimentos realizados. Su participación ha sido como investigador post-doctoral, bajo la asesoría de la Dra. Alejandra A. Covarrubias, y recibiendo apoyo directo a través del presupuesto asignado a este proyecto. Alexis ha contribuido no sólo en la realización sino también en el análisis de los datos.
- El Dr. José Polania Perdomo, quien se incorporó recientemente a este proyecto por su interés, sólido conocimiento y experiencia adquirida durante su larga estancia en el Centro Intenacional de Agricultura Tropical (CIAT, Colombia) en el cultivo de frijol y el estudio de las respuesta a sequía de este cultivo. El no recibió apoyo de este proyecto sino de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, laborando en el Instituto de Biotecnología-UNAM, con la asesoría de la Dra. Alejandra A. Covarrubias.
- El Dr. Jorge Acosta Gallegos (INIFAP, Campo Experimental Celaya, Guanajuato), quien con su amplia experiencia en el cultivo de frijol y en el impacto de la sequía sobre el mismo, contribuyó en la selección de los cultivares, en el establecimiento de las condiciones experimentales, en las cruzas requeridas para la generación de las poblaciones recombinantes que nos permitirán identificar algunos caracteres claves en

esta respuesta, y nos proporcionó las semillas necesarias para todos los experimentos realizados.

- El Dr. Alfredo Herrera Estrella (LANGEBIO-CINVESTAV, Irapuato), cuya participación ha sido primordial para la obtención e interpretación de los datos de transcriptómica y de genómica de los cultivares analizados durante este proyecto.
- El Dr. José Juan Ortiz Ordaz (LANGEBIO-CINVESTAV, Irapuato) contribuyó con su experiencia en la realización de los experimentos de metabolómica que, en esta fase, sólo se enfocaron en la obtención de los niveles de la hormona ácido abscísico (ABA), la cual está íntimamente relacionada con las respuestas de las plantas a estrés abiótico, particularmente, a condiciones de restricción de agua.

Producción

- - A. Acosta-Maspons, I. González-Lemes I, A. A. Covarrubias. *Improved protocol for isolation of high-quality total RNA from different organs of Phaseolus vulgaris L. Bio Techniques.* 66: 96-98 (2019)

-- J. A. Polania, C. C. C. Chater, A. A. Covarrubias, I. M. Rao. *Phaseolus species responses and tolerance to drought. Chapter 3. pp: 319-336. In: The Plant Family Fabaceae - Biology and Physiological Responses to Environmental Stresses. M. Hasanuzzaman et al. (eds.), The Plant Family Fabaceae. ©Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2020*

-- I. González-Lemes, A. Acosta-Maspons, J. A. Polania, J. Cetz, A. Herrera-Estrella, J. A. Acosta-Gallegos, A. A. Covarrubias. *Carbon dioxide recycling and concentration in pods are key metabolic processes in the resistance to terminal drought in common bean (Phaseolus vulgaris L.). En preparación.*

- José A. Polania, Violeta Salazar, Alexis Acosta-Maspons, Ingrid González-Lemes, Jorge Acosta-Gallegos, Caspar C. C. Chater, Alejandra A. Covarrubias. *Water-use patterns and stomatal dynamics under well-watered and drought conditions among resistant and susceptible to terminal drought genotypes of Phaseolus species. En preparación.*

Bibliografía

1. Acosta-Gallegos JA, Kohashi-Shibata J (1989) Effect of water stress on growth and yield of indeterminate dry beans (*Phaseolus vulgaris*) cultivar. *Field Crops Res.*20: 81-93.
2. Acosta-Gallegos JA, Sánchez-García BM, Jiménez-Hernández Y, Montero-Tavera V, Mendoza Hernández FM, Herrera-Hernández G, Silva-Rosales L. (2011) Flor de Mayo Dolores: nueva variedad de frijol para riego y temporal en Guanajuato. *Rev Mex Cien Agríc* 2: 6.
3. Beebe S, Rao IM, Blair MW, Acosta-Gallegos JA (2013) Phenotyping common beans for adaptation to drought. *Front Physiol* 4: 1–20.
4. Boyer JS, Westgate ME (2004) Grain yields with limited water. *J Exp Bot* 55: 2385-2394
5. Cuéllar-Ortiz S, Arrieta-Montiel MP, Acosta-Gallegos J, Covarrubias AA (2008) Relationship between carbohydrate partitioning and drought resistance in common bean. *Plant Cell Environ* 31: 1399-1409.
6. FAO (2009) La agricultura mundial. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/Issues_papers_SP/La_agricultura_mundial.pdf
7. FAO (2011) FAOSTAT: *FAO Statistical Databases*. Disponible en: <http://faostat.fao.org/>
8. Polania J, Idupulapati M, Rao C, Cajiao C, Rivera M, Raatz B, Beebe S (2016) Physiological traits associated with drought resistance in Andean and Mesoamerican genotypes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Euphytica* 210: 17–29.
9. Polania JA, Poschenrieder C, Beebe S, Rao IM (2016) Effective use of water and increased dry matter partitioned to grain contribute to yield of common bean improved for drought resistance. *Front Plant Sci* 7: 660.
10. Rendón-Anaya et al. (+15 authors) (2017) Genomic history of the origin and domestication of common bean unveils its closest sister species. *Genome Biol* 18:60 DOI 10.1186/s13059-017-1190-6.
11. Rosales MA, Cuéllar-Ortiz S, Arrieta-Montiel MP, Acosta-Gallegos J, Covarrubias AA (2012) Physiological traits related to terminal drought resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Sci Food Agric* 93: 324-331.