

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Regulación genética durante la imbibición y su relación con la capacidad germinativa del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones con baja disponibilidad de agua

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios del Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Biotecnología

DELMY SAYURY CASTILLO CRISÓSTOMO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2023

Dedicatoria

Le dedico este trabajo a mi madre Sofia Crisóstomo por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida. A mi padre José Castillo (†) porque su recuerdo me inspira a poner en práctica sus enseñanzas. A mis hermanos y sobrinos por siempre estar a mi lado y motivarme a caminar hasta lo alto de la montaña.

Porque él da la sabiduría, y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia.

Proverbios 2:6

Agradecimientos

A mi familia, por su amor y apoyo incondicional.

Al Dr. Luis Barboza por sus enseñanzas, ideas y conocimientos compartidos durante el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Jose Pablo Jiménez y Dr. Néstor Chaves por sus recomendaciones para poder finalizar esta investigación.

A Andrea Holst, Miguel Benavides, Ester Vargas y Joselin Piedra por el apoyo, la guía y el tiempo brindando durante las actividades realizadas.

A todo el personal del CIGRAS por abrirme las puertas y el apoyo brindando en algún punto del desarrollo de la investigación y por brindarme su amistad.

Al CATIE y CIAT por el germoplasma brindado para el desarrollo de la investigación.

Al LANOTEC y a Reinaldo Pereira por su ayuda con el trabajo en microscopía electrónica.

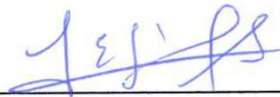
Al Instituto Tecnológico de Costa Rica y Dr. Jose Pablo Jiménez por su apoyo con el análisis bioinformático.

A la oficina de intercambio alemán (DAAD) por la beca otorgada para el desarrollo de esta investigación.

Al ICTA por el apoyo y la oportunidad de continuar con mis estudios.

A mis amigos y compañeros de vida por hacer más liviano el camino.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado y título de Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Biotecnología”



Dr. Luis Gómez Alpizar

Representante de la Decana Sistema de Estudios de Posgrado



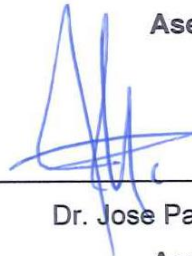
Dr. Luis Orlando Barboza Barquero

Director de Tesis



Dr. Nestor Chaves Barrantes

Asesor



Dr. Jose Pablo Jiménez

Asesor



Dra. Catalina Salas Durán

Directora del Programa de Posgrado Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales



Delmy Sayury Castillo Crisóstomo

Candidata

Tabla de contenido

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos	iii
Hoja de aprobación.....	iv
Tabla de contenido	v
Resumen	viii
Summary	ix
Lista de Cuadros.....	x
Lista de Figuras	xi
Lista de Ecuaciones.....	xiii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Germinación	4
2.2 Imbibición.....	4
2.2.1 Factores que intervienen en la imbibición.....	5
2.2.2 Medición de la imbibición por medio de imágenes.....	6
2.2.3 Regulación genética en el proceso de imbibición	8
2.2.4 Regulación genética de la imbibición bajo estrés	10
2.3 Estudios de resistencia a sequía en frijol	11
2.4 Enfoques genómicos	12
2.4.1 Transcriptoma	12
3 OBJETIVOS	14
3.1 General.....	14
3.2 Específicos	14
4 METODOLOGÍA	15

4.1	Lugar de estudio	15
4.2	Material genético.....	15
4.3	Métodos para determinar la genética del proceso de imbibición mediante cruzamientos controlados.....	16
4.3.1	Cruzamientos	16
4.3.2	Análisis de imbibición	17
4.3.3	Validación de método por imágenes contra método gravimétrico	18
4.3.4	Extracción de ADN de parentales y cruzamientos	18
4.3.5	Verificación de poblaciones por marcadores moleculares	19
4.4	Métodos para la identificación de genes involucrados en el proceso de imbibición y segregación del gen <i>pectin acetiltransferasa 8</i>	20
4.4.1	Extracción de ARN	20
4.4.2	Análisis del gen <i>pectina acetiltransferasa 8</i>	20
4.4.3	Diseño de marcadores moleculares	21
4.5	Método para identificar diferencias morfológicas a nivel celular	22
4.5.1	Caracterización histológica a nivel celular	22
4.5.2	Caracterización microestructural del hilio-micrópilo	23
4.6	Método para relacionar la poca imbibición de agua con la capacidad de germinar en ambientes con poca disponibilidad de agua	23
4.6.1	Análisis de imbibición y germinación	23
4.7	Análisis estadísticos.....	25
5	RESULTADOS	27
5.1	Determinación de la genética del proceso de imbibición mediante cruzamientos controlados.....	27
5.1.1	Validación de método por imágenes versus método gravimétrico	27
5.1.2	Análisis de imbibición en los parentales	27

5.1.3	Análisis de imbibición en cruzamientos	29
5.1.4	Verificación de cruzamientos	38
5.2	Identificación de genes involucrados en el proceso de imbibición.....	39
5.2.1	Expresión diferencial de genes entre genotipos de alta y baja imbibición.....	41
5.2.2	Expresión diferencial de genes a la primera y sexta hora de imbibición.....	43
5.2.3	Análisis del gen <i>pectina acetilesterasa 8 (PAE-8)</i>	46
5.3	Diferencias morfológicas a nivel celular y microestructural en semillas	48
5.4	Relación de la poca imbibición de agua con la capacidad de germinativa.....	52
6	DISCUSIÓN.....	56
6.1	Imbibición en cruzamientos contrastantes.....	56
6.2	Genes involucrados en el proceso de imbibición	58
6.2.1	Expresión diferencial de genes entre genotipos de baja y alta imbibición.....	58
6.3	Diferencias morfológicas a nivel celular en las semillas	61
6.4	Relación de la poca imbibición de agua con la capacidad de germinativa.....	62
7	CONCLUSIONES	66
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

Resumen

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es un grano básico de gran importancia a nivel mundial para la alimentación, esto debido a su alto contenido de proteínas, así como ser fuente de hierro, zinc y vitaminas. Una de las etapas primordiales para el establecimiento de un cultivo es la germinación. La germinación es un proceso que da origen a una planta, que inicia con la absorción de agua (imbibición). El Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) identificó genotipos de frijol que absorben mucha agua (1,7-3,0 veces su volumen inicial) y genotipos que absorben poca (1,0-1,5 veces de su volumen inicial), durante la imbibición, pero que ambos germinan igual (mayor al 90%). Por lo que, el objetivo de la investigación fue determinar los factores genéticos involucrados durante el proceso de imbibición y la relación de la capacidad germinativa del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de baja disponibilidad de agua. Con modelos lineales generalizados se determinó que el tamaño de la semilla y el genotipo influyen en la imbibición en los parentales y en la generación F₂. La relación entre el tamaño y la imbibición es negativa en los parentales y F₂, ya que, al aumentar el tamaño de la semilla, la tasa de imbibición disminuye en 0,29 y 0,38 respectivamente. En la generación F₃ no hubo influencia del tamaño de la semilla en la imbibición. Por medio de un análisis de transcriptoma se encontró un total de 6812 genes expresados diferencialmente entre los genotipos de baja y alta imbibición a la primera hora de imbibición. Se encontró que a nivel celular los genotipos G17913 y G16130 (ambos de baja imbibición) presentaron un área mayor en el tamaño de las células del parénquima medular del cotiledón de 3994,29 μm^2 y 3163,1 μm^2 , respectivamente. El genotipo G16885 (con alta imbibición) mostró una mayor velocidad de germinación tanto en condiciones de estrés hídrico (-0,4 MPa, PEG6000) como en el control. En conclusión, los datos sugieren que el fenotipo de imbibición es un rasgo poligénico, con una expresión diferencial de genes entre genotipos de alta y baja imbibición, que es afectado por las características morfológicas externas e internas de la semilla que provoca diferentes tasas de absorción de agua que influyen en la velocidad de germinación.

Summary

The bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a basic grain of great importance worldwide for food, due to its high protein content, as well as being a source of iron, zinc, and vitamins. One of the most important stages for the establishment of a crop is germination. Germination is a process that gives rise to a plant, which begins with the absorption of water (imbibition). The Center for Grain and Seed Research (CIGRAS) identified bean genotypes that absorb water 1.7-3.0 times their initial volume, and genotypes that absorb 1.0-1.5 times their initial volume, during imbibition, but both germinate equally (greater than 90%). Therefore, the objective of the research was to determine the genetic factors involved in the imbibition process and the relationship between germination capacity and conditions of low water availability. Using generalized linear models, it was found that seed size and genotype influence imbibition in the parental and F₂ generations. The relationship between size and imbibition is negative in the parental and F₂, since, as seed size increases, imbibition rate decreases by 0.29 and 0.38, respectively. In the F₃ generation, there was no influence of seed size on imbibition. By transcriptome analysis, a total of 6812 genes were found to be differentially expressed between low and high imbibition genotypes at the first hour of imbibition. It was found at the cellular level that genotypes G17913 and G16130 (both with a low imbibition phenotype) presented a larger area in the medullary cotyledon parenchyma, with cell size of 3994.29 μm^2 and 3163.1 μm^2 , respectively. Genotype G16885 (with high imbibition) showed higher germination speed under both water stress (-0.4 MPa, PEG6000) and control conditions. In conclusion, the data suggest that imbibition is a polygenic trait, with differential gene expression between high and low imbibition genotypes, which is affected by external and internal morphological characteristics of the seed causing different rates of water absorption that influence germination speed.

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Genotipos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) utilizados en la investigación procedentes de la colección de respaldo de CIAT.	15
Cuadro 2. Cruzamientos de genotipos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	16
Cuadro 3. Líneas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) evaluadas en la generación filial 2 (F ₂).....	17
Cuadro 4. Descripción de imprimadores evaluados en poblaciones F ₁ de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).	19
Cuadro 5. Descripción de los imprimadores Pv03 evaluados en genotipos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).	20
Cuadro 6. Descripción de los imprimadores evaluados en genotipos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) para identificar INDEL.	21
Cuadro 7. Descripción de los tratamientos bajo estrés hídrico en los genotipos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	24
Cuadro 8. Características fenotípicas de los parentales y generaciones F ₁ y F ₂ de genotipos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	29
Cuadro 9. Parámetros de los modelos lineales generalizados ajustados en las variables imbibición y área de los cruzamientos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.). .	30
Cuadro 10. Parámetros de los modelos lineales generalizados ajustados en los parentales y generaciones F ₁ , F ₂ y F ₃ de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	37
Cuadro 11. Genes expresados diferencialmente en la fase de imbibición de semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	40
Cuadro 12. Lista de genes expresados diferencialmente entre genotipos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) de alta y baja imbibición.....	42
Cuadro 13. Lista de genes expresados diferencialmente a la primera y sexta hora de imbibición en semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	45
Cuadro 14. Análisis marginal de contrastes del tamaño de células del parénquima del área del hipocótilo de semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	50

Lista de Figuras

Figura 1. Relación entre los valores de imbibición (20 horas) cuantificado mediante métodos gravimétrico e imágenes digitales en frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)..	27
Figura 2. Razón de crecimiento del área (RCA) de las semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) de las generaciones autopolinizadas 1 (S ₁)..	28
Figura 3. Razón de crecimiento del área (RCA) de las semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) de las generaciones autopolinizadas 2 (S ₂)..	28
Figura 4. Análisis del fenotipo de imbibición y área de semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) del cruzamiento entre las accesiones G11787xG12858A..	31
Figura 5. Análisis del fenotipo de imbibición y área de semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) del cruzamiento entre accesiones G16885xG11007..	32
Figura 6. Análisis del fenotipo de imbibición y área de semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) del cruzamiento entre accesiones G16130xG16885..	33
Figura 7. Análisis del fenotipo de imbibición y área de semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) del cruzamiento entre accesiones G17913xG16885..	34
Figura 8. Histograma de frecuencias de imbibición y área de semillas de plantas F ₃ de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)..	35
Figura 9. Fenotipo de imbibición y área de semillas F ₃ de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) del cruzamiento entre accesiones G16885xG17913..	36
Figura 10. Relación entre la imbibición y área de la semilla de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)..	37
Figura 11. Curvas de fusión de las cruzas de genotipos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) de baja imbibición por alta imbibición de semillas..	38
Figura 12. Curvas de fusión de las cruzas de genotipos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) de alta imbibición por baja imbibición de semillas..	39
Figura 13. Análisis de componentes principales en frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) al momento de la imbibición..	40
Figura 14. Mapa de calor de expresión diferencial de genes entre genotipos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) de alta y baja imbibición..	41

Figura 15. Mapa de calor de expresión diferencial de genes a la primera y sexta hora de imbibición en frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	44
Figura 16. Alineación de secuencias de genotipos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)..	46
Figura 17. Alineamiento de secuencia de G4780 al genoma de referencia de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).	47
Figura 18. Curvas de fusión de genotipos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) con el alelo funcional (G4780) y alelo no funcional (G1375) del gen pectina acetil esterasa 8..	47
Figura 19. Estructura interna y anatómica de la semilla de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)..	48
Figura 20. Diferencias en el tamaño de células del parénquima medular del cotiledón de semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)..	49
Figura 21. Diferencias en el área de la lente y micrópilo en semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)..	51
Figura 22. Análisis de imbibición en genotipo de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) en condiciones de limitación de agua..	52
Figura 23. Curva de germinación de genotipos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) de baja y alta imbibición en condiciones de limitación de agua.....	53
Figura 24. Germinación máxima genotipos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) de baja y alta imbibición bajo limitación de agua (PEG6000 a -0,4 MPa)..	54
Figura 25. Área bajo la curva de la germinación (AUC) en genotipos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) en condiciones de limitación de agua.....	54
Figura 26. Tiempo para alcanzar el 50 por ciento de la germinación (t50) en semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) en condiciones de limitación de agua..	55
Figura 27. Factores que afectan a la imbibición y germinación de semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)..	65

Lista de Ecuaciones

Ecuación de la cinética de imbibición (1)	7
Ecuación de la razón de crecimiento de la semilla (RCA) (2).....	18
Ecuación de imbibición (g/g) (3)	18
Ecuación de solución MPa (PEG 6000) (4).....	23
Ecuación distribución binomial negativa (5)	25



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Delmy Sayury Castillo Crisóstomo, con cédula de identidad 132000383634, en mi condición de autor del TFG titulado Regulación genética durante la imbibición y su relación con la capacidad germinativa del frijol (Phaseolus vulgaris L.) en condiciones con baja disponibilidad de agua.

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.


FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

1 INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los granos más consumidos a nivel mundial, con una producción total de 27,6 millones de toneladas, en un área de 34,8 millones de hectáreas y un rendimiento promedio de 791,5 kg/ha a escala global según datos de 2020 (FAOSTAT, 2022). La producción se realiza principalmente en América Latina, Asia y África, en zonas áridas o semiáridas, donde las lluvias estacionales son irregulares y el déficit de humedad del suelo a menudo limita su producción (Assefa et al., 2015; Chaves-Barrantes et al., 2018; Mayor Duran et al., 2016).

El frijol responde a diferentes factores bióticos y abióticos en las diferentes etapas del cultivo (Schmutz et al., 2014a). La germinación es una de las etapas más importantes debido a que da origen a la nueva planta (Diaz-Baena et al., 2021; Miller et al., 2018; Nicolas et al., 2003). La germinación es el proceso de reanudación del crecimiento del embrión en la semilla hasta la protrusión de la radícula (Bove et al., 2001; Elias et al., 2012). La germinación inicia con la absorción de agua, etapa denominada imbibición (Benech-Arnold et al., 2004; Bewley & Black, 2013)

La imbibición es un proceso que consta de una fase I de imbibición rápida, donde se reinicia la actividad metabólica que resulta con una hidratación gradual de la semilla (Bove et al., 2001). Una fase II lenta, que sucede cuando la tasa de imbibición supera el 60 por ciento e inicia la expansión celular (Bove et al., 2001; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Finalmente, una fase III de toma rápida de agua, pero más lenta en comparación a la fase I debido al crecimiento del embrión y emergencia de la radícula (Bewley & Black, 2013; Yongqi et al., 2020a).

En semillas de frijol, los embriones están cubiertos por la testa, considerada impermeable para la hidratación (Pérez Herrera & Acosta-Gallegos, 2002; Soltani et al., 2021). En la testa se encuentran tres cicatrices, hilio, lente y micrópilo, estructuras porosas que permiten la entrada de agua (Miano et al., 2018; Soltani et al., 2021). En estudios previos se han reportado tasas diferenciales de imbibición

entre genotipos de frijol asociado a la presencia de microgrietas en la lente, tamaño de la semilla, edad de la semilla y diferencias a nivel celular (Devkota et al., 2022; Siqueira et al., 2018; Soltani et al., 2021).

La imbibición es regulada por cambios metabólicos que dependen de la programación del ADN y la activación de la transcripción para el desarrollo de una plántula (Benech-Arnold et al., 2004; Kawakatsu et al., 2017; Shu et al., 2016; Stelpflug, 2015). En arroz se identificaron cambios transcripcionales en los procesos de transformación biológica, como la modificación de la pared celular asociado en facilitar la absorción de agua (Wei et al., 2015). Por otro lado, en maíz se encontraron genes relacionados con el metabolismo de los carbohidratos, actividad de la hidrolasa, degradación de proteínas, traducción, estructura de membrana y quinasas involucradas en cascadas de señalización (Stelpflug, 2015). Por último, en frijol se han reportado genes relacionados con la germinación e imbibición (Aubry et al., 2003; Soltani et al., 2021; Villanueva et al., 1999) asociados a funciones estructurales y el reconocimiento celular (Aubry et al., 2003; Soltani et al., 2021; Villanueva et al., 1999), pero el conocimiento aún es limitado en esta especie.

El análisis de imbibición requería anteriormente, métodos laboriosos que limitaban su estudio (McDonald et al., 1988; Pollock & Toole, 1966), pero actualmente se puede medir por medio de imágenes, lo cual reduce el tiempo empleado para evaluar este proceso (Gómez Bolaños, 2018; Miller et al., 2018; Valerio Cubillo et al., 2020). Este método determina el cambio de área de la semilla luego de la imbibición (Gómez Bolaños, 2018). Con este método, el Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica (UCR) identificó genotipos de frijol que absorben mucha agua (1,70-3 veces su volumen inicial) y genotipos que absorben poca (1,0-1,5 veces de su volumen inicial), durante la imbibición. Estos genotipos provienen de la colección del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), depositados como duplicado en el banco del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) y forman parte del proyecto "Viabilidad de las semillas de frijol provenientes del CIAT

luego de 30 años de almacenamiento en el banco duplicado de germoplasma del CATIE” (C0609 inscrito en Vicerrectoría de Investigación de la UCR).

Las variaciones en los eventos de precipitación debido al cambio climático y las áreas semi áridas destinadas a este cultivo (Assefa et al., 2015), pueden provocar déficit hídricos, que al momento de la siembra perjudican la germinación y el establecimiento del cultivo (Saux et al., 2020). Si las observaciones realizadas en los genotipos con tendencia a absorber mucha o poca agua, no está influenciado por el tiempo de almacenamiento (30 años) sino por la genética, hace pertinente investigar genes involucrados en la imbibición. Además, evaluar si las diferencias en la tasa de imbibición entre los genotipos otorgan una ventaja para germinar en ambientes con baja disponibilidad de agua para así optimizar el máximo potencial de una semilla para germinar y establecerse en el campo.

Por esta razón, en el presente estudio se identificaron genes involucrados en la regulación de la imbibición en genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) que tienen una respuesta contrastante y se evaluó la capacidad germinativa en condiciones de poca disponibilidad de agua.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Germinación

La germinación involucra diferentes procesos fisiológicos y metabólicos, para dar origen a una nueva planta, e inicia con la toma de agua lo que da lugar al crecimiento expansivo del embrión (Nicolas et al. 2003; Stelpflug 2015). La germinación se divide en tres fases: imbibición, activación del metabolismo y preparación para la elongación celular (Bove et al., 2001). Las primeras dos fase se observan incluso en semillas muertas o con dormancia (Benech-Arnold et al. 2004; Bewley y Black 2013). La fase de imbibición consiste en la toma de agua (Pollock & Toole, 1966). En la fase II se activan las enzimas que degradan los azúcares y reservas almacenados en la semilla (Torres et al., 2018). Este proceso finaliza con la ruptura de la testa y la emergencia de la radícula (Nicolas et al., 2003).

Los procesos fisiológicos y metabólicos en el proceso de germinación son regulados por genes cuya expresión está influenciada por el entorno, como lo son la temperatura, la disponibilidad de agua y la aireación (Benech-Arnold et al., 2004). Durante el proceso fisiológico, en el cual se da el cambio de semilla inactiva a activa, ocurre una regulación antagónica del ácido abscísico y de las giberelinas (Graeber et al., 2012; Shu et al., 2016). Por su parte, los procesos metabólicos provocan cambios en los contenidos de carbohidratos y otras reservas para continuar con los procesos post germinativos y crecimiento de la plántula (Bove et al., 2001). Por ejemplo, en *Cajanus cajan* se presenta una disminución de los contenidos de proteína cruda durante la germinación (Torres et al., 2018).

2.2 Imbibición

La imbibición es un proceso en el que la semilla absorbe agua y la distribuye hacia las estructuras internas por las grietas, defectos o espacios en la cubierta, en la que obtiene una ganancia de peso por el agua embebida (Benech-Arnold et al., 2004). Esta implica tres fases: una inicial de toma rápida de agua, una segunda de retraso (toma poca o nada de agua), y la tercera donde la absorción de agua es lenta en comparación con la primera debido al crecimiento del embrión y emergencia de la

radícula a través de la estructura que cubre la semilla (Ellies et al. 1985; Bewley y Black 2013).

La toma de agua de la semilla es un paso primordial para la rehidratación, así como para iniciar con los procesos metabólicos, donde la cantidad de agua requerida depende de la genética y de los constituyentes de la semilla (Benech-Arnold et al. 2004; Stelpflug 2015). Esta entra por capilaridad a una velocidad que decrece conforme transcurre el tiempo según la morfología de la semilla y crecimiento del embrión (Louf et al., 2018).

2.2.1 Factores que intervienen en la imbibición

En condiciones de campo, existen tres factores que controlan la toma de agua de una semilla seca: 1) las propiedades de la semilla con respecto al agua (potencial de agua en la semilla, difusividad del agua, permeabilidad de la testa), 2) la interacción de las propiedades del suelo y agua, y 3) las propiedades hidráulicas semilla/suelo (Benech-Arnold et al., 2004). A su vez, factores como potencial osmótico, concentración de los solutos, velocidad y tiempo de toma del agua, conductividad hidráulica, el estado del suelo, la temperatura y diferencia en la composición química de la semilla afectan la emergencia de la radícula (Benech-Arnold et al., 2004).

La temperatura y el potencial osmótico influyen en la tasa de absorción de agua; por ejemplo, una baja temperatura y un incremento en estrés osmótico reducen la tasa de absorción (Pollock & Toole, 1966). La fase de retraso y de absorción son dependientes de la temperatura y se ha observado que un aumento en la temperatura incrementa la tasa de imbibición (Kader y Jutzi 2002; Valerio Cubillo et al. 2020).

La absorción del agua puede ser desigual por las características estructurales de las semillas (Bewley & Black, 2013). En leguminosas, la estructura que cubre los embriones es la testa que tiene tres cicatrices: hilio, micropilo y lente (Miano et al.,

2018; Soltani et al., 2021). La testa restringe el intercambio gaseoso y ha sido reportada una menor cantidad de oxígeno en la semilla en comparación a otros tejidos (Nicolas et al., 2003). El hilio es una abertura porosa que puede cerrarse para impedir la entrada de agua (Ellies et al., 1985), y por lo tanto afectar la germinación. El micrópilo, es un pequeño poro extremo al hilio, donde ingresa el agua (Mikac et al., 2015). La lente es una estructura opuesta al micrópilo, que recientemente Soltani et al. (2021) reportaron la presencia de “microgrietas” en el área del lente en las semillas de frijol, que permiten la entrada de agua y son un factor importante para genotipos que presentan dormancia física.

En frijol se han realizado observaciones para determinar cómo ingresa el agua dentro de la semilla, en un estudio realizado por imágenes de resonancia micro-magnética con el método de imagen de un solo punto se determinó que el agua es absorbida a través de la lente (Kikuchi et al., 2006), lo cual también fue reportado por Soltani *et al.* (2021) quienes indican la importancia de esta estructura para la imbibición. Por el contrario, Mikac et al. (2015) en un estudio realizado por microscopía de resonancia magnética observaron que, durante el remojo, el agua ingresa al frijol a través del micrópilo, migrando por debajo de la cubierta de la semilla hacia hipocótilo y posteriormente se hidratan los cotiledones.

Por otro lado, la liberación rápida de la latencia requiere de la imbibición a temperaturas específicas (Graeber et al., 2012) y cambios en la concentración de hormonas endógenas (Nicolas et al., 2003). Las giberelinas son hormonas primarias que incrementan la imbibición (Shu et al., 2016). Otras hormonas involucradas son: auxinas, jasmonatos y brasinoesteroides (Yongqi et al., 2020b).

2.2.2 Medición de la imbibición por medio de imágenes

Los estudios de la imbibición de semillas se han realizado por medio de la diferencia entre peso inicial y peso final luego del proceso de absorción de agua, con base en la humedad inicial e implica la disección de la semilla (Pollock & Toole, 1966). También se hace esta medición con diferentes concentraciones de polietilenglicol

para medir el potencial hídrico (McDonald et al., 1988), los cuales son métodos muy laboriosos. Por lo tanto, en la actualidad se han propuesto la medición de la imbibición por medio de imágenes. Este método consiste en la evaluación de la cinética de la semilla por medio del cambio de área del grano luego de la absorción del agua, con base en la fórmula:

$$A = Af(1 - e^{-kt}) \quad (1)$$

Donde, Af es el área final,

k es el coeficiente de crecimiento o tasa de crecimiento,

t es el tiempo y

e exponencial (Miller et al. 2018).

Miller et al. (2018) propusieron un prototipo para la captura de datos de imbibición en maíz (*Zea mays* L.) por medio de imágenes, de la cual se obtuvieron datos de tasa de crecimiento (k) y aumento del área de la semilla. Los resultados sugieren que la tasa de imbibición (k) y porcentaje de aumento en el área de superficie de la semilla estuvieron influenciados por el genotipo.

La medición de la imbibición por imágenes es un primer acercamiento para realizar estudios genéticos con datos del fenotipo, en donde la tasa de crecimiento “k” se utiliza para identificar loci de caracteres cuantitativos QTL (“Quantitative trait loci”, por sus siglas en inglés) (Miller et al., 2018). Stelpflug (2015) con base en los datos fenotípicos de tasa de imbibición (k) y porcentaje de aumento del área de superficie en líneas endogámicas de maíz, realizó un mapeo de asociación del genoma por medio de imágenes, donde encontró dos genes candidatos asociados a la tasa de imbibición: *ZmAMY1A* y *GRMZM2G172043*.

Por su parte, Gómez (2018), mediante la medición de la cinética en la imbibición en variedades de frijol, reportó un cambio en el área en el proceso y el cual varió según el genotipo. La cantidad de agua absorbida por los genotipos cuya tasa de

crecimiento (k) fue mayor también presentaron mayor expansión (área) y a su vez mayor porcentaje de germinación. Sin embargo, en este estudio se evaluaron pocos genotipos y se indicó la importancia de evaluar más muestras. El análisis por imágenes para valorar la cinética de hidratación es una forma de reducir costos, tiempo y error del operador en las pruebas de germinación. Estos estudios ayudan a entender cómo el grano absorbe agua y la cinética de expansión de la semilla (Valerio Cubillo et al., 2020).

2.2.3 Regulación genética en el proceso de imbibición

La activación de una semilla requiere de la toma de agua a temperaturas específicas (Graeber et al., 2012). En arroz se hizo una categorización de eventos moleculares que ocurren durante la germinación a las 0, 12 y 48 horas iniciada la imbibición los cuales son: regulación epigenética de la expresión génica, morfogénesis de estructura anatómica y unión de carbohidratos. A las 12 horas de iniciada la imbibición se identificaron cambios transcripcionales drásticos, en los procesos de transformación biológica como la modificación de la pared celular asociado posiblemente para facilitar la absorción de agua (Wei et al., 2015).

El contenido de GA se regula al alza en esta fase (Shu et al., 2016), lo cual coincide con lo encontrado por Wei et al. (2015), que ocurre la activación de genes de transducción del ácido giberélico como *GA*, *GID1*, *GID2*, *SLR1* y activadores transcripcionales de *GAMYB*. Además, genes responsables de la biosíntesis y señalización de brasinoesteroides, que aumentaron luego de iniciada la imbibición y se acumularon continuamente hasta la finalización de la germinación (Wei et al., 2015). En otro estudio en arroz se encontró que la mayoría de los genes expresados diferencialmente en la imbibición inicial (8 horas de imbibición) pertenecen a los reguladores que contiene el dominio *AP2*, genes relacionados con etileno, ácido jasmónico y auxinas (Yongqi et al., 2020). Además, en este estudio indican que la subfamilia de genes *DREB*, proteínas de unión a elementos sensible a la deshidratación, pueden participar en la vía de respuesta al estrés cuando las

semillas pasan de estado seco a hidratadas, a través de la regulación de la síntesis de hormonas (Yongqi et al., 2020).

En *Arabidopsis* se reportó la expresión del gen *RGL2*, relacionado con las giberelinas, su expresión se incrementó entre las 12 horas y 48 horas luego del inicio de la toma de agua, en las fases posteriores la expresión del gen decrece. Este gen es parte de la familia DELLA y actúa como un inhibidor de la germinación, las giberelinas contrarrestan el efecto de *RGL2* (Lee et al., 2002).

En maíz se realizó un análisis de enriquecimiento basado en la ruta de procesos biológicos asociados con la tasa de imbibición, enfoque para entender la arquitectura y base molecular de rasgos cuantitativos (Stelpflug, 2015). En dicho estudio se encontró 58 términos biológicos enriquecidos de genes, tres regiones genéticas y dos genes candidatos *ZmAMY1A* (*GRMZM2G103055*) y *GRMZM2G172043*. El primero codifica una proteína α -amilasa putativa expresada a las 24 y 48 horas después de la imbibición y el segundo codifica una β -1 putativa, proteína 3-glucanasa, asociados a la tasa de imbibición.

La alfa amilasa son enzimas responsables de la hidrólisis y movilización del almidón durante la germinación en cereales y tiene un rol en el vigor de las plántulas, esta enzima es regulada por giberelinas (Stelpflug, 2015). El gen *GRMZM2G172043* relacionado al β -glucanasa que potencialmente participa en la remodelación y ruptura de la pared celular durante la germinación temprana e imbibición. En este estudio en maíz demostraron que hay una relación significativa entre la tasa de imbibición y el tiempo de emergencia de la radícula y el porcentaje total de germinación (Stelpflug, 2015).

Ahora bien, en frijol se han evidenciado genes y proteínas que regulan la germinación, sin embargo, los estudios son limitados comparados con otras especies. En relación a la germinación se reportan las proteínas GLP (“Germin-Like Proteins”, por sus siglas en inglés) (Nicolas et al., 2003). El primer gen reportado en

la germinación de frijol es el *PvGLP1* (Aubry et al., 2003). El gen *PvGLP1* codifica una proteína de 206 aminoácidos, una glicoproteína. La expresión del gen *PvGlp1* no se detectó en las primeras horas sino hasta las 24 horas luego de la imbibición (Aubry et al., 2003).

Por otro lado, Villanueva *et al.* (1999) reportan la actina en niveles bajos en semillas secas de frijol y, muestra un incremento y expresión a las 6 horas iniciada la imbibición. Esta proteína (gen *ACT7*) también fue encontrada en *Arabidopsis*, en el hipocótilo y testa de la semilla, el cual es un componente fundamental del citoesqueleto que participa en varios procesos celulares (Gallardo et al., 2001).

Por último, en de frijol se encontró un QTL principal asociado a la absorción de agua en Pv03, el intervalo del QTL posee 11 genes. Estos resultados sugieren el cambio de frecuencia alélica de un ortólogo de *pectina acetiltransferasa-8-2* por la inserción de 5-pb, que causo una rápida absorción de agua en las semillas (Soltani et al., 2021). Estos resultados resaltan el papel que juega la *pectina acetiltransferasa 8* en la dormancia y germinación de la semilla (Palmer et al., 2021; Soltani et al., 2021).

2.2.4 Regulación genética de la imbibición bajo estrés

En un análisis proteómico de arroz se identificaron 14 proteínas involucradas en la imbibición de semillas bajo estrés salino. La expresión de ocho genes como *BPM*, *PKP*, *GLU3*, *GLU2.1*, *GLU2.3*, *GAS8*, *GLU2.2* y *GSS* se incrementó durante la imbibición en condiciones de estrés salino en la fase II (o de retraso), 24 horas después del inicio de la imbibición (Xu et al., 2017).

Las proteínas identificadas por Xu *et al.* (2017) están vinculadas al metabolismo energético y los mecanismos de evitación del estrés salino. La proteína globulina cupina CDP3.1 es la responsable del control de la germinación de semillas arroz bajo estrés salino. Por su parte Zhao, J et al. (2019), reportan 1544 genes diferencialmente expresados en la fase I, después de 8 horas de imbibición en arroz. Los genes relacionados en respuesta a estreses abióticos en la fase inicial de la

imbibición en arroz corresponden a 5 genes por sequía (inducida con sal), 4 genes al calor, 2 genes al frío, 2 genes a heridas y 3 genes asociados con factores abióticos. Las proteínas relacionadas con estos genes son: proteínas dominio cupin, metiltransferasa y proteínas relacionadas al dominio SPX (J. Zhao et al., 2019).

La expresión de genes relacionados con estrés abiótico como los reportados en arroz por Xu et al. (2017) y Zhao, J et al (2019) pueden contribuir a conferir tolerancia al estrés durante la imbibición en semillas de arroz. En frijol se han identificado proteínas y genes relacionados con la germinación (Villanueva et al. 1999; Aubry et al. 2003), lo que resalta la necesidad de conocer los genes que regulan el proceso de imbibición (Zargar et al., 2017).

2.3 Estudios de resistencia a sequía en frijol

En frijol se han reportado líneas tolerantes a sequía. Entre estas se encuentran las reportadas por Assefa et al. (2015), Mayor Duran et al. (2016), Polania et al. (2017) y Chaves-Barrantes et al. (2018) quienes identificaron líneas de frijol común en condiciones de sequía temprana, intermitente y terminal. Estas líneas son útiles como progenitores en los programas de mejoramiento. Para algunas regiones áridas y semiáridas se han recomendado variedades de frijol, como Wairimu dwarf, Wairimu, Piriton and KAT B9, por su capacidad de germinación temprana (Mwami et al., 2017).

Posteriormente, Polania et al. (2017) reportaron que los rasgos de brotes y raíces contribuyen en la tolerancia a sequía intermitente en líneas recombinantes de frijol común. Es decir, las líneas identificadas como tolerantes a sequía tienen un sistema de raíces vigoroso y más profundo, mientras que las otras un sistema de raíces de moderado a superficial. No se tiene conocimiento hasta el momento de la relación de la imbibición y la resistencia a la sequía durante la fase de germinación y establecimiento de la planta en campo.

2.4 Enfoques genómicos

El frijol es una especie diploide y su genoma está secuenciado (O'Rourke et al., 2014). De acuerdo con Zargar et al. (2017), el genoma es de 587 Mb y está dispuesto en 708 andamios ("scaffolds") de los cuales se han ensamblado 473 Mb. Esta es una ventaja para encontrar genes con los diferentes enfoques y herramientas biotecnológicas sobre un rasgo de interés para el mejoramiento genético del cultivo, por ejemplo, se han identificados genes relacionados con un mayor tamaño de semilla (Schmutz et al., 2014).

Enfoques para realizar análisis genéticos podrían ser: análisis genómico, análisis del transcriptoma, análisis proteómico, análisis metabolómico y análisis fenómico (Zargar et al., 2017; L. Zhao et al., 2019). El análisis genómico identifica nuevos genes y marcadores asociados a QTLs; el análisis del transcriptoma proporciona información de la expresión de genes en diferentes procesos; el análisis proteómico indica la diferencia de expresión y función de las proteínas; el análisis de metabolómica permite la identificación de metabolitos endógenos y exógenos; y el análisis fenómico realiza la caracterización fisiológica, bioquímica y morfológica (Nadeem et al., 2018; O'Rourke et al., 2014; Zargar et al., 2017).

2.4.1 Transcriptoma

El análisis de transcriptoma consiste en el estudio de los perfiles de expresión de genes en células, tejidos, órganos y otras partes de la planta (Bove et al., 2001; S. Jiang et al., 2020; O'Rourke et al., 2014; Zargar et al., 2017). Con este análisis se logra la caracterización funcional y anotación de genes, construye planos para la reconstrucción de redes de interacción para comprender las funciones celulares, el crecimiento y desarrollo, y los sistemas biológicos (Z. Jiang et al., 2015).

El objetivo final de este tipo de análisis es encontrar aquellos genes que se expresan diferencialmente en diferentes condiciones biológicas, muchas de ellas en respuesta a estreses bióticos o abióticos. Los genes se detectan mediante herramientas computacionales que utilizan puntuaciones de expresión génica

normalizadas y pruebas estadísticas (Mutz et al., 2013; Wei et al., 2015; N. Zhang et al., 2014).

Algunas metodologías utilizadas para evaluar la expresión de genes son: microarreglos y secuenciación de alto rendimiento (Mutz et al., 2013; O'Rourke et al., 2014). Las tecnologías de microarreglos y secuenciación del transcriptoma (RNA-seq, por sus siglas en inglés) se realizan con análisis de ARN directo o por la conversión de ARN a ADN copia (Hrdlickova et al., 2017; O'Rourke et al., 2014; Wei et al., 2015). La desventaja de los microarreglos es que se limitan a la cantidad de ARN, la cuantificación de los niveles de transcripción y requiere información del genoma o transcritos de referencia (Hrdlickova et al., 2017; Mutz et al., 2013). Por otro lado, con los métodos de RNA-seq se genera información más robusta, que revela directamente la identidad de la secuencia o transcrito (Hrdlickova et al., 2017) y se puede evaluar con o sin genoma de referencia (Mutz et al., 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 General

- Determinar los factores genéticos involucrados durante el proceso de imbibición y la relación de la capacidad germinativa del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de baja disponibilidad de agua.

3.2 Específicos

- Determinar si la imbibición es regulada genéticamente mediante estudio de la segregación de esta característica en progenies de cruzamientos controlados.
- Identificar genes involucrados en el proceso de imbibición mediante el análisis de transcriptoma y estudio de segregación del gen *pectina acetilesterasa 8*.
- Identificar diferencias morfológicas a nivel celular en las semillas de los genotipos de alta y baja imbibición.
- Relacionar la poca imbibición de agua con la capacidad de germinar en ambientes con poca disponibilidad de agua.

4 METODOLOGÍA

4.1 Lugar de estudio

El estudio se realizó en los laboratorios e invernadero del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), en la Universidad de Costa Rica. La semilla utilizada fue producida durante junio 2021 a agosto 2022, con tres generaciones autopolinizadas a partir de la semilla inicial que provenía del Banco de Germoplasma del CATIE, conforme las recomendaciones para el cultivo de frijol. La siembra de los 18 genotipos y los cruzamientos se realizó bajo condiciones controladas en invernadero con sistema de riego por aspersión, hasta alcanzar su maduración y recolectar las semillas.

4.2 Material genético

Las muestras fueron 18 accesiones provenientes de la colección mundial de respaldo de frijol del CIAT depositadas en CATIE, resguardadas hace 30 años, de las cuales se identificaron ocho genotipos de frijol de baja imbibición (absorben de 1,0-1,5 su volumen inicial), cinco genotipos de alta imbibición (absorben 1,7-3,0 veces su volumen inicial) y genotipos que absorben mediana agua (1,5-1,7 su volumen inicial), y todos los grupos tienen una germinación mayor al 90% (Cuadro 1), identificados en un estudio previo (datos no publicados). Se utilizaron 10 semillas por accesión. De los parentales se obtuvieron tres generaciones autopolinizadas a partir de las semillas iniciales, identificadas como S₁, S₂ y S₃.

Cuadro 1. Genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizados en la investigación procedentes del CATIE de la colección de respaldo del CIAT.

No. Accesoión	Fenotipo ^a	Origen	Cultivar	DOI
G11007	Baja	México	Variedad-Criolla	10.18730/JP7PT
G11811	Baja	Perú	Variedad-Criolla	10.18730/PEDDV
G12858A	Baja	Perú	SR ^b	10.18730/S1S2~
G16130	Baja	Perú	Variedad-Criolla	10.18730/JSK3P
G11921	Baja	México	Variedad-Criolla	10.18730/JNJ1U
G17913	Baja	Hungría	Variedad-Criolla	10.18730/JT4GR
G11083	Baja	México	Variedad-Criolla	10.18730/JPATF
G12071	Baja	Perú	Variedad-Criolla	10.18730/JHGQ5

G11577	Mediana	Perú	Variedad-Criolla	10.18730/JQ28S
G11086	Mediana	México	Variedad-Criolla	10.18730/JPAG5
G11057	Mediana	México	Variedad-Criolla	10.18730/JPA9=
G11378	Mediana	México	Variedad-Criolla	10.18730/JPZC7
G11317	Mediana	México	Variedad-Criolla	10.18730/JPXTZ
G11787	Alta	Perú	Variedad-Criolla	10.18730/JQJP~
G10962	Alta	México	Variedad-Criolla	10.18730/JP67G
G16885	Alta	Guatemala	Variedad-Criolla	10.18730/JHKZ=
G13094	Alta	México	Azufrado Pimono-78	10.18730/PMCM4
G13935	Alta	Guatemala	Variedad-Criolla	10.18730/JS7SY

^a Fenotipo: baja 1,0-1,5 veces de su volumen inicial; mediana >1,5-<1,7 veces de su volumen inicial; alta 1,7-3 veces su volumen inicial. ^b Sin registro

4.3 Métodos para determinar la genética del proceso de imbibición mediante cruzamientos controlados

4.3.1 Cruzamientos

Se realizaron cruces controlados de los tres grupos para obtener la generación filial 1 (F₁) (Cuadro 2). Los genotipos parentales fueron identificados como P₁ a los receptores de polen (♀) y P₂ a los donadores del polen (♂). Las flores de los P₁ fueron emasculadas y polinizadas manualmente, luego fueron selladas para evitar contaminación con otro polen y se identificaron. Luego se obtuvieron las semillas de la generación filial 2 (F₂) autofecundas.

Cuadro 2. Cruzamientos de genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

No.	Cruzamiento	Fenotipo de imbibición	Nomeclatura ^a
1	G16885xG17913	AltaxBaja	P ₁ ♀xP ₂ ♂
2	G17913xG11317	BajaxMediana	P ₁ ♀xP ₂ ♂
3	G17913xG10962	BajaxAlta	P ₁ ♀xP ₂ ♂
4	G11317xG11083	MedianaxBaja	P ₁ ♀xP ₂ ♂
5	G11317xG11083	MedianaxBaja	P ₁ ♀xP ₂ ♂
6	G11317xG11083	MedianaxBaja	P ₁ ♀xP ₂ ♂
7	G11787xG12858A	AltaxBaja	P ₁ ♀xP ₂ ♂
8	G16885xG11007	AltaxBaja	P ₁ ♀xP ₂ ♂

9	G11317xG11921	MedianaxBaja	P _{1♀} xP _{2♂}
10	G11317xG16130	MedianaxBaja	P _{1♀} xP _{2♂}
11	G16130xG11317	BajaxMediana	P _{1♀} xP _{2♂}
12	G16130xG16885	BajaxAlta	P _{1♀} xP _{2♂}
13	G16885xG16130	AltaxBaja	P _{1♀} xP _{2♂}
14	G12071xG11083	MedianaxBaja	P _{1♀} xP _{2♂}
15	G12071xG11083	MedianaxBaja	P _{1♀} xP _{2♂}
16	G11057xG17913	BajaxBaja	P _{1♀} xP _{2♂}

^a P₁: genotipo receptor del polen (♀) y P₂: genotipo donador del polen (♂)

4.3.2 Análisis de imbibición

Esta prueba se realizó con análisis de imágenes digitales como describe Gómez Bolaños (2018), con algunas modificaciones, que consistió en ensayos independientes de las semillas obtenidas de los cruzamientos (Cuadro 2), las poblaciones F₂ (Cuadro 3) y una población F₃ del cruzamiento G16885xG17913 con sus respectivos parentales (Cuadro1) con por lo menos dos repeticiones con 10 semillas. Las semillas fueron escarificadas y se colocaron sobre papel de germinación azul (Anchor paper Co. Minnesota, 243 USA, 15,4 x 46 cm), dentro de un molde de acrílico y se agregaron 800 ml de agua.

Cuadro 3. Líneas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) evaluadas en la generación filial 2 (F₂).

No.	Cruzamiento	Fenotipo	Nomenclatura ^a
1	G16885xG17913	AltaxBaja	P _{1♀} xP _{2♂}
2	G17913xG11317	BajaxMediana	P _{1♀} xP _{2♂}
3	G17913xG10962	BajaxAlta	P _{1♀} xP _{2♂}
4	G11317xG11083	MedianaxBaja	P _{1♀} xP _{2♂}
5	G11317xG11083	MedianaxBaja	P _{1♀} xP _{2♂}
6	G11317xG11083	MedianaxBaja	P _{1♀} xP _{2♂}
7	G11787xG12858A	AltaxBaja	P _{1♀} xP _{2♂}
8	G16885xG11007	AltaxBaja	P _{1♀} xP _{2♂}
9	G11317xG11921	MedianaxBaja	P _{1♀} xP _{2♂}
10	G16130xG16885	BajaxAlta	P _{1♀} xP _{2♂}

^a P₁: genotipo receptor del polen (♀) y P₂: genotipo donador del polen (♂)

Las mediciones se realizaron cada 15 minutos durante 20 horas para cuantificar la cantidad de agua absorbida a una temperatura constante de 30°C (Promedio +/- 2), iluminación constante (lámparas fluorescentes) y humedad relativa 90%. Se calculó la Razón de crecimiento del área de la semilla (RCA) como:

$$RCA = \frac{\text{Área final}}{\text{Área inicial}} \quad (2)$$

La tasa de imbibición para las semillas de la F₃ del cruzamiento G16885xG17913 se midió con el método gravimétrico, se registró el peso seco de las semillas al inicio (tiempo 0) y luego se pesaron las semillas a las 20 horas posterior a la imbibición en una balanza analítica 253 (Voyager Ohaus, sensibilidad 0,001). La imbibición se calculó como:

$$\text{Imbibición (g/g)} = \frac{\text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \quad (3)$$

4.3.3 Validación de método por imágenes contra método gravimétrico

La imbibición mediante análisis de imágenes se comparó con el método gravimétrico. Se utilizaron 141 semillas de 12 parentales y seis cruzamientos. El método gravimétrico se llevó a cabo al cuantificar el peso seco de la semilla al inicio (tiempo 0) y luego se pesaron las semillas a las 20 horas posterior a la imbibición en una balanza analítica (Voyager Ohaus, sensibilidad 0,001). La tasa de absorción se calculó como se describió en la sección anterior.

4.3.4 Extracción de ADN de parentales y cruzamientos

Se recolecto tejido de las primeras hojas de tres plantas de cada parental (P₁ y P₂) y los cruzamientos (F₁) a los 15 días después de la siembra. El ADN fue aislado por el protocolo de bromuro de etil trimetilamonio (CTAB, por sus siglas en inglés) (Doyle, 1990), con un volumen total de 25 µl. La concentración de las muestras de ADN se determinó mediante nanofotómetro (NanoPhotometer Pearl, Implen GmbH, Múnich, Alemania).

4.3.5 Verificación de poblaciones por marcadores moleculares

Las poblaciones F₁ fueron verificadas por medio de marcadores moleculares (Cuadro 4) para identificar que sean híbridos, según el método descrito por Ganopoulos et al. (2012), que se basa en fusión de alta resolución (HRM, por sus siglas en inglés).

Cuadro 4. Descripción de imprimadores evaluados en poblaciones F1 de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

Nombre del oligo	Sentido	Secuencia (5' a 3')	Referencia
BM139	Forward	TTAGCAATACCGCCATGAGAG	Gaitán-Solís et al., (2002).
	Reverse	ACTGTAGCTCAAACAGGGCAC	
BM172	Forward	CTGTAGCTCAAACAGGGCACT	Gaitan-Solis et al. (2002).
	Reverse	GCAATACCGCCATGAGAGAT	
BM189	Forward	CTCCCACTCTCACCCCTCACT	Gaitan-Solis et al. (2002).
	Reverse	GCGCCAAGTGAAACTAAGTAGA	
BM210	Reverse	ACCACTGCAATCCTCATCTTTG	Gaitan-Solis et al. (2002).
	Forward	CCCTCATCCTCCATTCTTATCG	
BM143	Forward	GGGAAATGAACAGAGGAAA	Ganopoulos et al., (2012).
	Reverse	ATGTTGGGAACTTTTAGTGTG	
BM187	Forward	TTTCTCCAACACTCACTCCTTTCC	Ganopoulos et al. (2012).
	Reverse	TGTGTTTGTGTTCCGAATTATGA	
BM167	Forward	TCCTCAATACTACATCGTGTGACC	Ganopoulos et al. (2012).
	Reverse	CCTGGTGTAACCCTCGTAACAG	

La reacción utilizada para este análisis fue la siguiente: 2,3 µL de H₂O DEPC, 5 µL de MeltDoctor (Applied Biosystems), 0,35 µL imprimador forward y 0,35 µL imprimador reverse. Luego se realizó el PCR en tiempo real con perfil de corrida inicial durante 10 minutos a 95°C, desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, alineamiento a 60°C durante 30 segundos y una extensión final de 65°C durante 1 minuto con 44 ciclos. Luego el perfil del HRM fue 60-65°C con una tasa de incremento de 0,1°C cada 10 segundos, en BIO-RAD C1000 (Touch™ Thermal Cycler). Se utilizaron muestras de los P₁, P₂, F₁ y un control negativo (agua) con tres repeticiones.

4.4 Métodos para la identificación de genes involucrados en el proceso de imbibición y segregación del gen *pectin acetiltransferasa 8*

4.4.1 Extracción de ARN

Se trabajó con 10 ejes embrionarios de un genotipo de alta (G16885) y baja (G17913) imbibición, los cuales se congelaron en nitrógeno líquido luego de 1 hora para ambos genotipos, con tres repeticiones, y 6 horas de iniciada la imbibición para el genotipo G16885, con dos repeticiones. Posteriormente, se maceraron las muestras para obtener 50 mg de polvo fino. El ARN total se aisló usando el kit RNeasy Plant Mini (QIAGEN) con el buffer RLC de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración de las muestras de ARN se determinó mediante espectrofotómetro (Thermo Scientific™ NanoDrop™ One/One) y la calidad se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% desnaturalizada. Las muestras fueron enviadas para la secuenciación DNBSEQ en BGI, California, Estados Unidos.

4.4.2 Análisis del gen *pectina acetiltransferasa 8*

Se evaluó la presencia de la mutación reportada en este gen según Soltani et al. (2021) en dos genotipos reportados por Soltani et al. (2021), una es la accesión G4780 con el alelo funcional (sin la inserción de 5pb) y la accesión G1375 con el alelo no funcional (inserción de 5pb), según datos de secuenciación Sanger obtenidos por los investigadores. Se probaron dos pares de imprimadores reportados por Soltani et al. (2021) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Descripción de los imprimadores Pv03 evaluados en genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

Nombre oligo	Sentido	Secuencia (5' a 3')	Referencia
Pv3-40634091	Forward	TTAGCAATACCGCCATGAGAG	Soltani et al. (2021)
	Reverse	ACTGTAGCTCAAACAGGGCAC	
Pv3-53035007	Forward	CTGTAGCTCAAACAGGGCACT	Soltani et al. (2021).
	Reverse	GCAATACCGCCATGAGAGAT	

Se utilizó la técnica PCR en tiempo real (qPCR) para amplificar la secuencia de interés. La reacción utilizada para este análisis fue la siguiente: 4,6 µL de H₂O DEPC, 7,5 µL de SYBRGreen, 0,45 µL imprimador forward y 0,45 µL imprimador reverse. La amplificación tuvo una programación inicial desnaturalización a 95°C durante 10 minutos y 44 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 minutos, alineamiento a 60°C durante 30 segundos, 95°C durante 30 segundos, con una extensión final de 65°C durante 1 minuto. Estos fragmentos se enviaron a secuenciar (Secuenciación Sanger) al laboratorio del Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica. Los datos de las secuencias fueron alineados en BioEdit (v7.2.5) y se hizo un BLAST en Primer-BLAST para identificar la inserción.

4.4.3 Diseño de marcadores moleculares

Se diseñaron imprimadores para detectar la inserción con la herramienta Primer3Plus (Cuadro 6) con la secuencia del gen *Phvul.003G277600.1* para análisis en PCR-HRM. Se tomaron en cuenta los siguientes criterios: tamaño aproximado de 150 pares de bases, una T_m similar entre el imprimador forward y reverse, que estuvo entre 59,1°C a 59,8°C, no formación de dímeros, con porcentaje de 36,4 a 50 de GC y que amplifique en una sola región. Con estos marcadores fueron evaluados dos genotipos testigos G4780 y G1375, reportados con la presencia y ausencia de la mutación (Soltani et al., 2021), respectivamente, con dos repeticiones.

Cuadro 6. Descripción de los imprimadores evaluados en genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) para identificar INDEL.

Nombre del oligo	Secuencia (5' a 3')
PAE_indel_e7_F	CCTTGATGATTTGGCACTTTT
PAE_indel_e7_R	GAAAAAGCAAGTGAAAGCCAAT
PAE_indel_e6_F	TGGGTCATCGTTTACTGGTG

La reacción utilizada para este análisis fue la siguiente: 4,45 µL de H₂O DEPC, 7,5 µL de MeltDoctor (Applied Biosystems), 0,525 µL imprimador forward y 0,525 µL

imprimador reverse. Luego se realizó el PCR en tiempo real con perfil de corrida inicial durante 10 minutos a 95°C, desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, alineamiento a 56,1°C durante 30 segundos y una extensión final de 65°C durante 1 minuto con 44 ciclos. Luego el perfil del HRM fue 60-65°C con una tasa de incremento de 0,1°C cada 10 segundos, en BIO-RAD C1000 (Touch™ Thermal Cycler).

4.5 Método para identificar diferencias morfológicas a nivel celular

4.5.1 Caracterización histológica a nivel celular

Se prepararon cortes transversales a partir de semillas de 3 genotipos de baja imbibición y un genotipo de alta imbibición. Las semillas se cortaron por la mitad para separar los dos cotiledones. Luego se procedió a fijar las muestras según Arias et al. (2019), que consistió en colocar las semillas en una solución con 10 por ciento de formalina al 37%, 85 por ciento de alcohol etílico al 70% y cinco por ciento de ácido acético, durante 24 horas a temperatura ambiente.

Luego de transcurrido el tiempo de fijación, las muestras se procesaron para la deshidratación, el aclaramiento y la infiltración. La deshidratación consistió en pasar seis veces las muestras por alcohol etílico a diferentes concentraciones (70, 80, 90, 95 y 100 por ciento) a temperaturas de 50-60°C entre 5 y 10 minutos. El aclaramiento se realizó al pasar la muestra por una solución 1:1 de alcohol etílico 100 % y xilol, luego dos veces por xilol durante 10 minutos a 50°C. Posteriormente, se pasaron las muestras por xilol/parafina (Paraplast) con safranina por 20 minutos en estufa a 60° y 5 minutos al vacío. Por último, se colocaron en parafina dos veces por 20 minutos en estufa (5 minutos iniciales al vacío y estufa).

La inclusión de las semillas se realizó en un molde de inclusión metálico el cual fue llenado con parafina. Una vez seca la parafina, se separó el bloque del molde metálico para proceder a realizar los cortes de la semilla con un micrótopo rotatorio Reichert-Jung 820H Histostat (Leica, Wetzlar, Alemania). Las muestras se colocaron en un portaobjetos y posteriormente las muestras se desparafinaron con

xilol (2 veces), alcohol etílico de mayor a menor concentración (70, 95 y 100%), 2 veces, y agua por 1 minuto. Se tiñó con azul de Toloudina durante 20 minutos. Luego se aclararon con dos cambios de xilol para finalmente montar con medio de montaje para portaobjetos (Permount), se observó en un microscopio invertido (Axio Vert.A1, Zeiss, Göttingen, Alemania) y se obtuvieron imágenes de los cotiledones y ejes embrionarios con la cámara fotográfica DP74 (Olympus, Tokio, Japón) acoplada al microscopio.

4.5.2 Caracterización microestructural del hilio-micrópilo

Para identificar diferencias entre el hilio-micrópilo entre genotipos de baja y alta imbibición se seleccionaron dos accesiones, la G17913 (baja imbibición) y la G16885 (alta imbibición), con 5 repeticiones por genotipo. Las semillas se colocaron en una base de metal con cinta con doble capa de carbón y una de aluminio, luego se recubrieron con una capa de 200nm de oro sin fijar ni procesar en un cobertor iónico (DENTONVAUUM, Desk V) a una corriente de 20mA por 150 segundos. Por último, se colocaron en el microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM 6390LV (Tokio, Japón). Este análisis se realizó en el Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LANOTEC).

4.6 Método para relacionar la poca imbibición de agua con la capacidad de germinar en ambientes con poca disponibilidad de agua

4.6.1 Análisis de imbibición y germinación

Se realizó una prueba preliminar para determinar el tratamiento que limita la disponibilidad de agua. Esto se realizó a diferentes soluciones con polietilenglicol (PEG6000, Sigma-Aldrich, Alemania) a -1,0 MPa, -0,5 MPa y -0,3 MPa de potencial hídrico, que fue calculado según Michel & Kaufmann (1973), en dos genotipos (NAMBI y G16885). Se evaluó la capacidad germinativa según las Reglas Internacionales ISTA (versión 2018) para análisis de semillas por 5 días. Con el dato de germinación se ajustó un modelo lineal para determinar la solución de PEG que disminuye la germinación al 50 por ciento (Ecuación 4).

$$\text{Solución MPa (PEG6000)} = -0,74 + 0,005 (\% \text{ germinación}) \quad (4)$$

$$-0,74 + 0,007 * 50 = -0,39 \text{ MPa potencial hídrico}$$

A partir de este cálculo se diseñó un experimento completamente al azar con dos factores (Cuadro 7). El factor 1 fueron los tratamientos: testigo (agua) y solución PEG6000 a -0,4MPa de potencial hídrico y el factor 2 los genotipos: con dos genotipos de baja imbibición G17913 y G11007, un genotipo de alta G16885 y un testigo comercial NAMBI, con 10 semillas por cada repetición (tres repeticiones). Las semillas se colocaron en una caja de plástico de 11×11 centímetros con tapa sobre papel de germinación de celulosa con 15 ml de la solución (Agua o PEG6000). La prueba fue colocada en cámara de germinación (HOTECH, modelo 624) a una temperatura constante de 30°C (Promedio +/- 2), iluminación constante (lámparas fluorescentes) y humedad relativa 90% por 120 horas.

Cuadro 7. Descripción de los tratamientos bajo estrés hídrico en los genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Factor 1 (Tratamiento)	Factor 2 (Genotipos)
Testigo	G11007
Testigo	G17913
Testigo	G16885
Testigo	NAMBI
PEG6000 a -0,4 MPa	G11007
PEG6000 a -0,4 MPa	G17913
PEG6000 a -0,4 MPa	G16885
PEG6000 a -0,4 MPa	NAMBI

Se calculó la imbibición a las 20 horas con el método gravimétrico, descrito en la sección 3.3.3. La capacidad germinativa se evaluó según las Reglas Internacionales ISTA (versión 2018) a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas, con los cuales se calculó la germinación máxima (gMAX), tiempo para alcanzar 50% de la germinación (t50), área debajo de la curva de germinación (AUC, por sus siglas en inglés) con el paquete GERMINATOR (Joosen et al., 2010). Se utilizaron semillas producidas bajo las mismas condiciones. Además, las semillas se almacenaron en condiciones de humedad controlada al 20 por ciento utilizando zeolita para este fin.

4.7 Análisis estadísticos

Determinación de la genética del proceso de imbibición mediante cruces controlados

La prueba de imbibición se analizó con el software ImageJ versión 2,35 (Schneider et al., 2012), con el que se obtuvo el área inicial y final. Para los datos de imbibición y área de la semilla se realizaron modelos lineales generalizados con el paquete stats. Se obtuvieron los valores de exactitud para calcular el valor predictivo de los modelos y los valores p (de dos colas) de distribución t de Wald. Para la comparación del método por imágenes y por balanza se utilizó un modelo de regresión lineal robusto del paquete estimatr (Blair et al., 2022) con la matriz de varianza covarianza ajustada tipo HC2 y valores p (de dos colas) calculados utilizando una aproximación de distribución t de Wald.

Detección de genes con expresión diferencial

El análisis fue realizado en una máquina virtual con sistema Ubuntu 20,04 LTS, 32 Intel® Xeon® CPU E5-4667 v3 @ 2.00 GHz y 252 GB de memoria RAM, cortesía de la Escuela de Ingeniería Electrónica, del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC). El control de calidad de los datos se realizó con el programa FastQC v0.11.9 (Andrews, 2010). Posteriormente, las lecturas se alinearon al genoma de referencia *Phaseolus vulgaris* (cultivar G19833) disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> con el uso de los programas HISAT2 v2.2.1 (Kim et al., 2015) y SAMtools v1.14 (Li et al., 2009). El conteo de lecturas alineadas a cada gen se hizo con el programa featureCounts v2.0.1 (Liao et al., 2014) y la cuantificación de la abundancia de transcritos se hizo con el programa Kallisto v0.48.0 (Bray et al., 2016). La expresión de genes diferenciales (“DE” por sus siglas en inglés) se hizo con el paquete DESeq2 (Love et al., 2014) de R, que utiliza un modelo lineal generalizado con una distribución binomial negativa (Ecuación 5).

$$P(x = k) = \binom{k + x - 1}{x} q^x p^k \quad (5)$$

Donde:

$P(x = k)$ x es el número de fracasos (k) necesarios antes de conseguir el r -ésimo éxito,

p es la probabilidad que ocurra un suceso, y

q es la probabilidad que no ocurra un suceso.

Los valores de p de la prueba de hipótesis múltiple se ajustaron al enfoque de Benjamini y Hochberg para controlar la tasa de descubrimiento falso (TDF). Los genes con TDF $<0,05$ se asignaron como expresados diferencialmente.

Identificación de diferencias morfológicas a nivel celular

Los datos del área de las células se obtuvieron con el uso de ImageJ (versión 2,35). Para la comparación del tamaño de las células de los cotiledones se ajustaron modelos lineales generalizados con el paquete stats. Se obtuvieron los valores de exactitud para calcular el valor predictivo de los modelos y los valores p (de dos colas) de distribución t de Wald. Además, se realizó un análisis mediante la estimación de las diferencias entre cada nivel de un factor (genotipos) con el método p -valor de Holm (1979).

Relación de la poca imbibición de agua con la capacidad de germinar en ambientes con poca disponibilidad de agua

El análisis de $gMax$ se hizo una comparación de medias de Kruskal Wallis para datos no paramétricos. Para los datos de AUC y $t50$ se realizaron pruebas de Shapiro-Wilk para verificar la normalidad de los datos (significancia al 5%), una prueba Bartlett para verificar la homogeneidad (significancia al 5%) y una prueba de medias de Tukey (significancia al 5%) para ambos factores con el uso del paquete AgroR (Shimizu G et al., 2022).

Los análisis se realizaron en el software estadístico R versión 4.2.0 (R Core Team, 2022).

5 RESULTADOS

5.1 Determinación de la genética del proceso de imbibición mediante cruzamientos controlados

5.1.1 Validación de método por imágenes versus método gravimétrico

Se observó una alta relación entre los valores obtenidos por el método de imágenes y los obtenidos por el método gravimétrico (Figura 1) con una pendiente de 0,99 (intervalo de confianza (IC) al 95% 0,90-1,08) e intersección 0,08 (95%IC, -0,03, 0,20) en el eje “y” cercano al cero, lo cual refleja que con ambos métodos las variables crecen juntas. El valor de p (<0,001) indica una correlación significativa y fuerte entre las variables ($R^2= 0,73$).

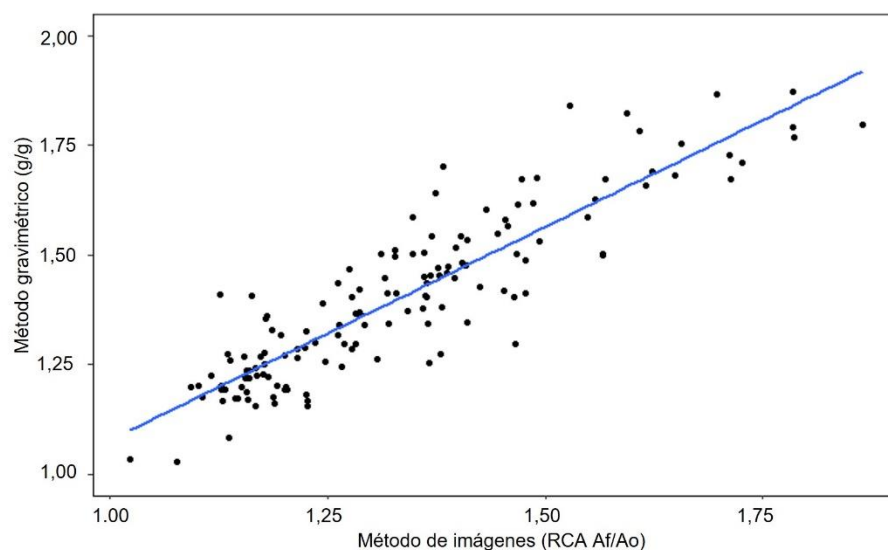


Figura 1. Relación entre los valores de imbibición (20 horas) cuantificado mediante métodos gravimétrico e imágenes digitales en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Método gravimétrico: Pf (peso final) /Po (peso inicial), método imágenes: RCA (Razón de crecimiento del área), At (área total) /Ao (área inicial). Los puntos indican la distribución de los datos. La línea azul representa la regresión lineal (n = 159).

5.1.2 Análisis de imbibición en los parentales

Las 18 accesiones en las primeras generaciones autopolinizadas (S_1) presentaron un valor menor de razón de crecimiento del área (RCA) de la semilla (Figura 2), al reportado inicialmente, a excepción de la accesión G11577, cuya RCA incrementó de 1,51 a 1,77. Al evaluar la siguiente generación (S_2) se observó que las

accesiones G16885 y G13094 disminuyeron la RCA a 1,61 y 1,66 respectivamente (Figura 3).

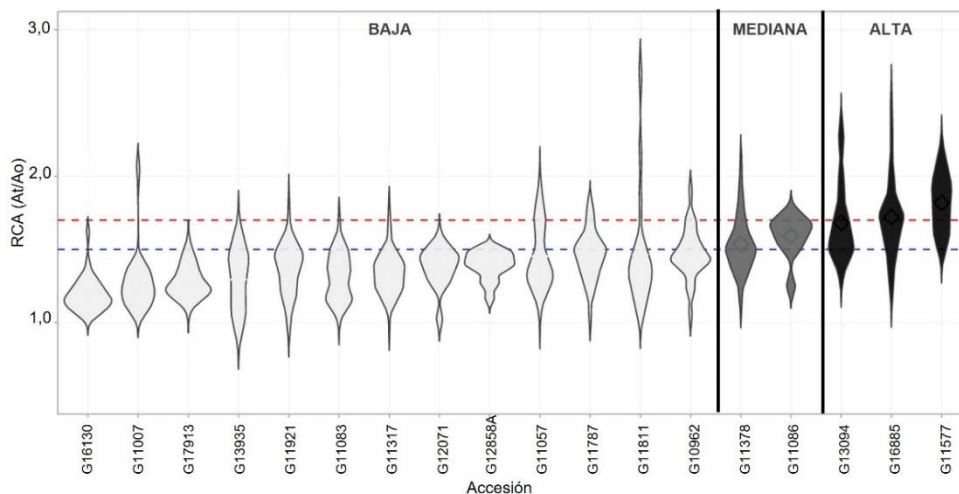


Figura 2. Razón de crecimiento del área (RCA) de las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de las generaciones autopolinizadas 1 (S_1). At: área total a 20 horas de imbibición, Ao: área inicial de la semilla. Línea punteada azul limita a grupos de imbibición baja <1,5 RCA y mediana 1,5 a 1,7 RCA. La línea punteada roja limita al grupo de imbibición mediana y alta >1,7 RCA. El violín muestra la distribución de los datos (n = 642).

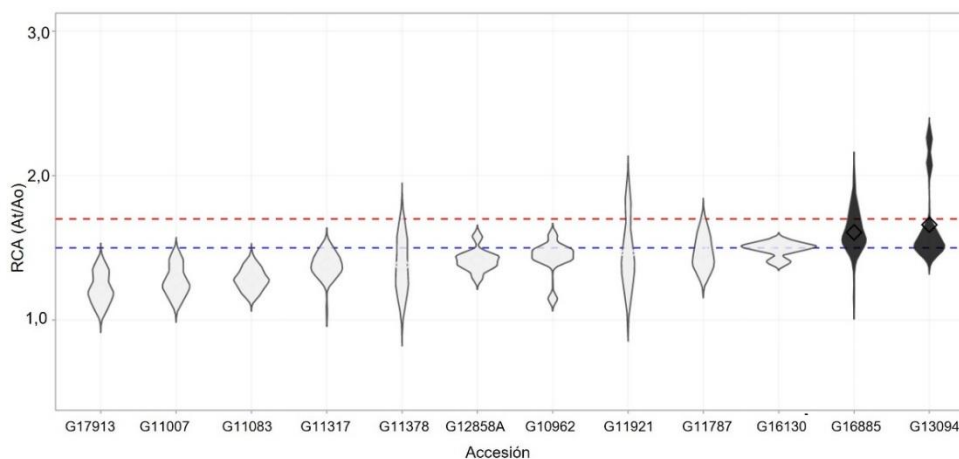


Figura 3. Razón de crecimiento del área (RCA) de las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de las generaciones autopolinizadas 2 (S_2). At: área total a 20 horas de imbibición, Ao: área inicial de la semilla. Línea punteada azul limita a grupos de imbibición baja <1,5 RCA y mediana 1,5 a 1,7 RCA. La línea punteada roja limita al grupo de imbibición mediana 1,5 a 1,7 RCA. El violín muestra la distribución de los datos (n = 246).

5.1.3 Análisis de imbibición en cruzamientos

Se obtuvieron 16 cruzamientos de los cuales 10 fueron evaluados hasta F₂, cuatro de estos mostraron patrones diferenciales entre los parentales en cuanto a la tasa de imbibición. De estos el cruzamiento G16885xG17913 fue evaluado hasta F₃. Los rasgos fenotípicos (Cuadro 8) de color de flor, hábito de crecimiento, color de semilla y color de cotiledón se registró para los cuatro cruzamientos.

Cuadro 8. Características fenotípicas de los parentales y generaciones F₁ y F₂ de genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

Cruzamiento	Generación	Color cotiledón	Hábito crecimiento ^b	Color flor	Color semilla
G11787xG12858A	P ₁ ^a	Verde	Tipo IV	Blanco	Crema con manchas rojas
	P ₂ ^a	Amarillo pálido	Tipo IV	Blanco	Gris con manchas café
	F ₁	Verde	Tipo IV	Blanco	Crema con manchas rojas
	F ₂	Amarillo pálido y verde	Tipo IV	Blanco	Gris con manchas café
G16885xG11007	P ₁ ^a	Morado	Tipo IV	Rosado	Negra
	P ₂ ^a	Amarillo pálido	Tipo III	Blanca	Morada mancha crema
	F ₁	Amarillo con rojizo Morado y amarillo	Tipo II	Rosado	Negra
	F ₂	con rojizo	Tipo IV	Rosado, blanco y con rosado	Negra
G16130xG16885	P ₁ ^a	Verde	Tipo IV	Rosado	Amarillo dorado con manchas negras
	P ₂ ^a	Morado	Tipo IV	Rosada	Negro
	F ₁	Verde mancha rojizas	Tipo IV	Rosada	Amarillo dorado con manchas negras
	F ₂	Verde, amarillo con rojizo	Tipo IV	Rosada	Negras
G16885xG17913	P ₁ ^a	Morado	Tipo IV	Rosado	Negro
	P ₂ ^a	Verde	Tipo II	Blanco	Crema suave
	F ₁	Amarillo con rojizo	Tipo II	Rosado	Negro
	F ₂	Amarillo pálido, amarillo con café rojizo	Tipo I, II y IV	Blanco, rosado, blanco con rosado	Negro

^a P₁: recepto de polen ♀ y P₂: donador del polen ♂. ^b Hábito de crecimiento Tipo I: arbustivo determinado, Tipo II: arbustivo indeterminado, Tipo III: indeterminado postrado, Tipo IV: trepador indeterminado.

Con los datos de imbibición y área de la semilla se ajustaron modelos para los cuatro cruzamientos con patrones diferenciales (Cuadro 9), cuya variable explicativa son los genotipos. Los cruzamientos G11787xG12858A, G16885xG11007 y G16885xG17913 son el resultado de genotipos de alta por baja imbibición y el cruzamiento G16130xG16885 son genotipos de baja por alta imbibición (Cuadro 2).

Cuadro 9. Parámetros de los modelos lineales generalizados ajustados en las variables imbibición y área de los cruzamientos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

No.	Modelo	AIC ^a	Exactitud (%)	n
	G11787xG12858A	-96,07	58,57	62
1	Imbibición = genotipo	-108,49	62,63	
2	Área = genotipo			
	G16885xG11007	-125,71	88,74	64
3	Imbibición = genotipo	-140,35	91,45	
4	Área = genotipo			
	G16130xG16885	-37,99	69,28	64
5	Imbibición = genotipo	-78,18	96,67	
6	Área = genotipo			
	G16885xG17913	-68,50	82,83	63
7	Imbibición = genotipo	-68,47	95,56	
8	Área = genotipo			

^aAIC: Criterio de información de Akaike.

La tasa de imbibición promedio del genotipo G12858A fue de 1,38 con IC al 95% (1,32-1,45) y del genotipo G11787 fue de 1,5 con IC al 95% (1,42-1,52), siendo un cruzamiento entre genotipo de alta (G11787) por baja (G12858A) imbibición (Figura 4). La F₁ presentó una tasa de imbibición de 1,26 con IC al 95% (1,11-1,42) con una diferencia de 0,21 con el parental G11787 (p-valor 0,019) (Figura 4A). Las semillas de la F₂ tuvieron una diferencia de 0,08 con IC al 95% (0,10-0,23) con respecto al parental G11787. El tamaño de la semilla fue diferente entre los parentales (Figura 4B), siendo el genotipo de baja imbibición con la mayor área 1,09 cm² con IC al 95% (1,05-1,13) con respecto a G11787 y la F₂ (Figuras 4B y 4C).

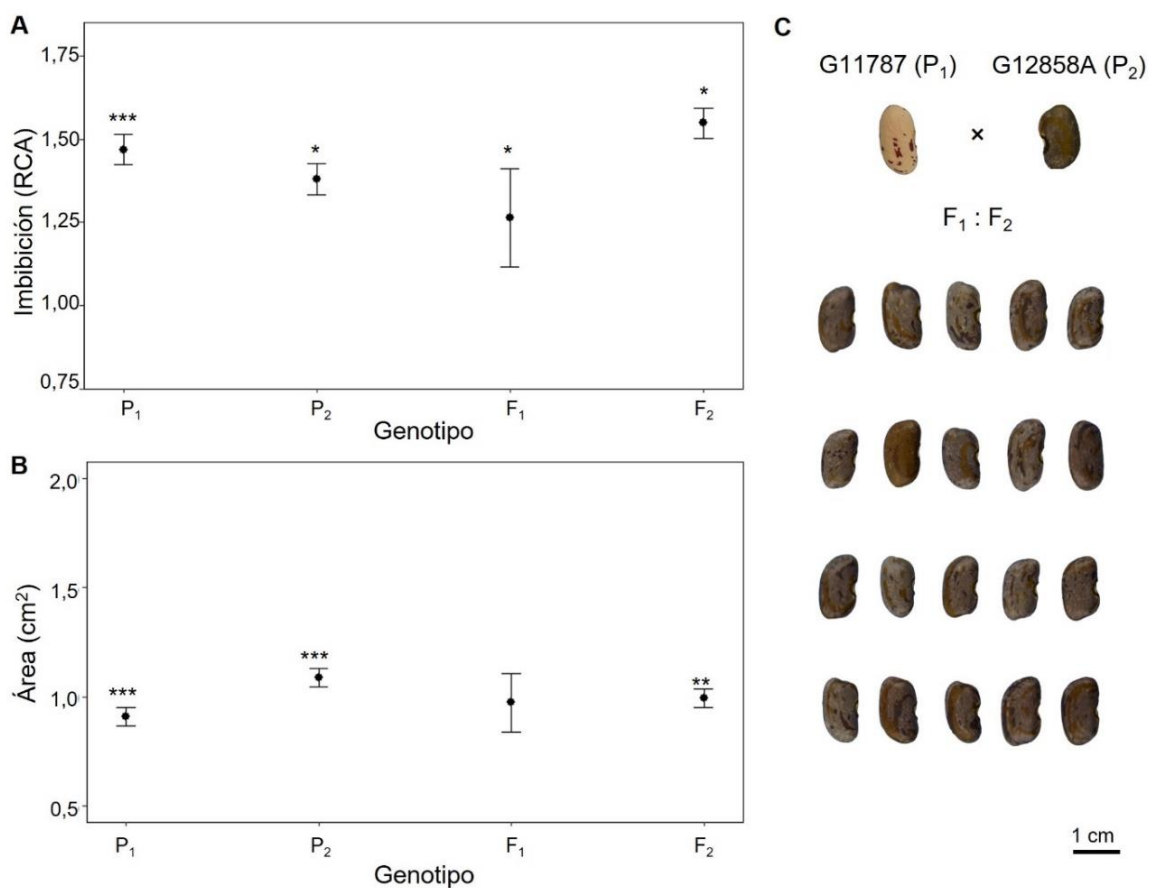


Figura 4. Análisis del fenotipo de imbibición y área de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) del cruzamiento entre las accesiones G11787×G12858A. A) Razón de crecimiento de la semilla (RCA): área total/área inicial. B) Tamaño de las semillas. C) Fenotipos de las semillas de: parental receptor de polen (P₁, G11787), parental donador de polen (P₂, G12858A), generación filial 1 (F₁), generación filial 2 (F₂), semillas F₂ provenientes de plantas F₁ (F₁:F₂). Los puntos indican los promedios y las barras el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas: $p = <0,001^{***}$, $p = 0.007^{**}$, $p = 0.009^*$ acorde a una distribución t de Wald.

Los genotipos G16885 y G11007 presentaron en promedio una imbibición de 1,69 con IC al 95% (1,61-1,78) y 1,27 con IC95% (1,24-1,31), respectivamente. Por lo tanto, fue un cruzamiento entre genotipo de alta (G16885) imbibición por baja (G11007) (Figura 5). Además, se encontró diferencias entre los parentales, F₁ y F₂ en cuanto a la cantidad de agua que absorben (Figura 5A). Las semillas con mayor área fueron del genotipo G11007 con un promedio de 1,05 cm² con un IC al 95%

(1,02-1,09). El genotipo G16885 y F₁ tuvieron las menores áreas de 0,63 cm² con IC al 95% (0,55-0,71) y 0,61 cm² (0,5-0,73) , respectivamente (Figura 5B).

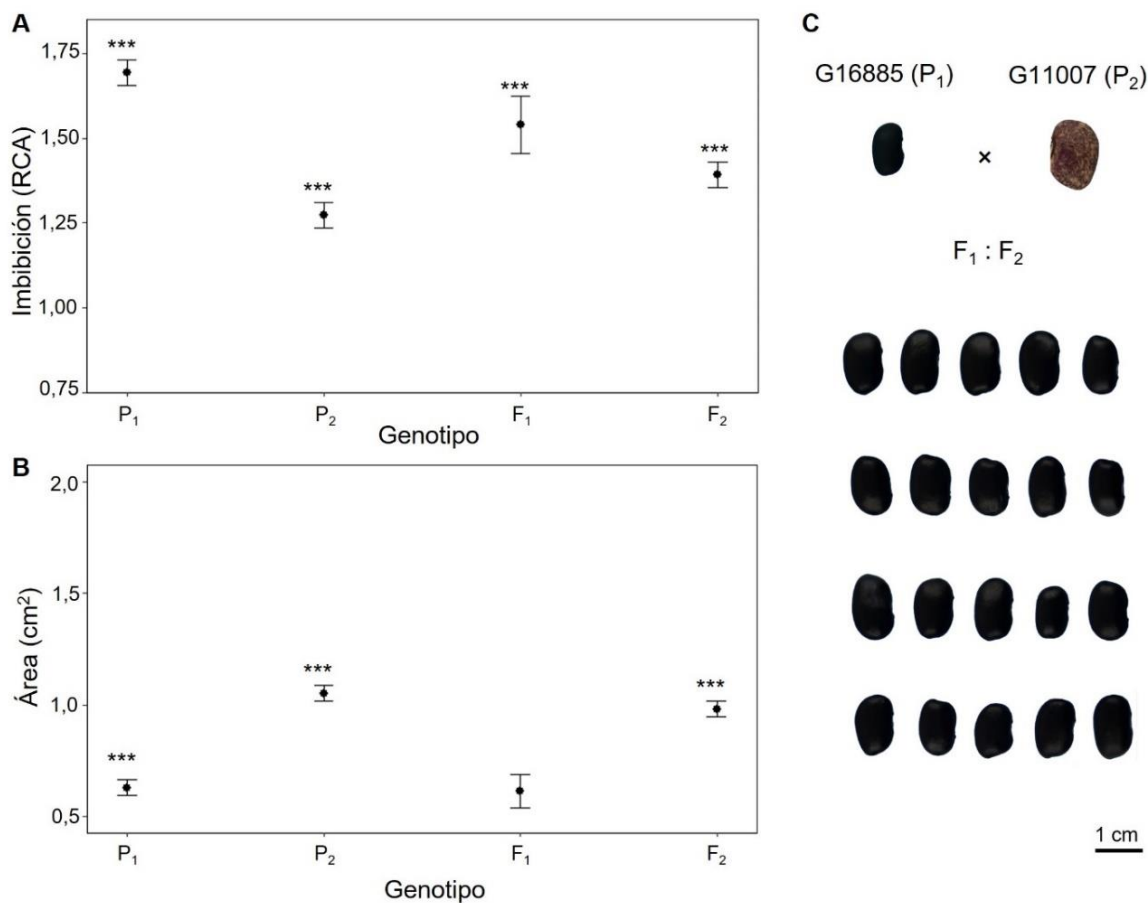


Figura 5. Análisis del fenotipo de imbibición y área de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) del cruzamiento entre accesiones G16885×G11007. A) Razón de crecimiento de la semilla (RCA): área total/área inicial. B) Tamaño de las semillas. C) Fenotipos de las semillas de: parental receptor de polen (P₁, G16885), parental donador de polen (P₂, G11007), generación filial 1 (F₁), generación filial 2 (F₂), semillas F₂ provenientes de plantas F₁ (F₁:F₂). Los puntos indican los promedios y las barras el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas: $p = <0,001^{***}$ acorde a una distribución t de Wald.

El genotipo G16130 tuvo una imbibición promedio de 1,30 con IC al 95% (1,12-1,49) y el genotipo G16885 tuvo una imbibición promedio de 1,63 con IC al 95% (1,55-1,71), cuya diferencia es significativa ($p < 0,001$). Las generaciones F₁ y F₂ tienen 0,52 (IC al 95% 0,70-0,33) y 0,22 (IC al 95% 0,32-0,11) menos con respecto al

genotipo G16885, respectivamente (Figura 6A). Las semillas de la F₁ presentaron la mayor área, en promedio 1,55 (IC al 95% 1,37-1,75). La F₂ presentó un área diferente a los parentales y F₁ (Figura 6B). Este cruzamiento es de baja por alta imbibición (Figura 6C).

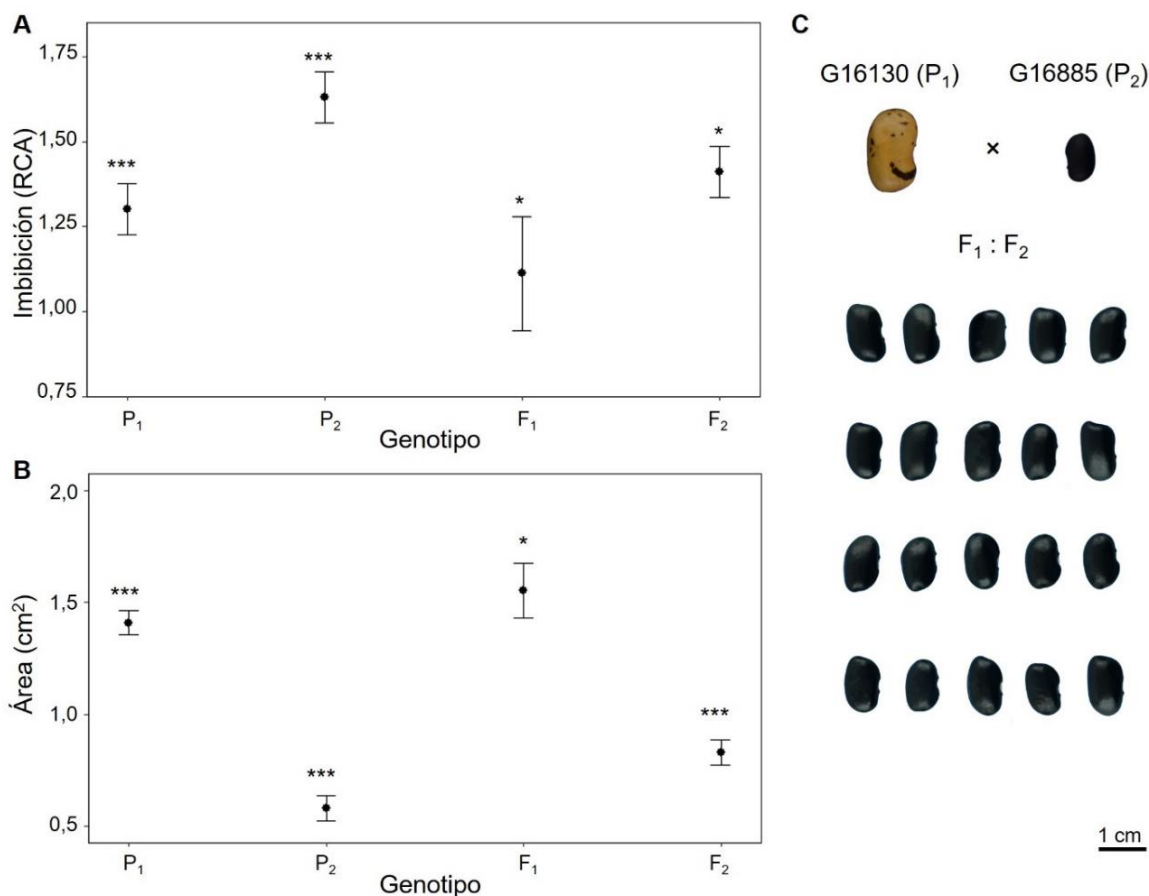


Figura 6. Análisis del fenotipo de imbibición y área de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) del cruzamiento entre accesiones G16130×G16885. A) Razón de crecimiento de la semilla (RCA): área total/área inicial. B) Tamaño de las semillas. C) Fenotipos de las semillas de: parental receptor de polen (P₁, G16130), parental donador de polen (P₂, G16885), generación filial 1 (F₁), generación filial 2 autofecundada (F₂), semillas F₂ provenientes de plantas F₁ (F₁:F₂). Los puntos indican los promedios y las barras el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas: p = <0,001***, p = 0.035* acorde a una distribución t de Wald.

La tasa de imbibición promedio del genotipo G17913 fue de 1,19 con IC al 95% (1,13-1,25), el genotipo G16885 presentó 0,46 con IC al 95% (0,38-0,54) más de

tasa de imbibición (Figura 7A). La F_1 presentó una tasa de imbibición de 1,55 con IC al 95% (1,36-1,71) con una diferencia de 0,36 con el parental G17913 (p -valor $<0,001$). El tamaño promedio de la semilla de los parentales G17913 fue de 1,72 cm^2 con IC al 95% (1,66-1,78) y G16885 fue de 0,63 cm^2 con IC al 95% (0,54-0,71). El área promedio de la F_1 fue de 0,73 cm^2 (0,57-0,89) y la F_2 fue de 1,01 cm^2 con IC al 95% (0,93-1,09), en ambas generaciones se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) (Figura 7B). Las semillas de las plantas F_1 fueron negras con un aumento en el tamaño en relación con P_1 (Figura 7C).

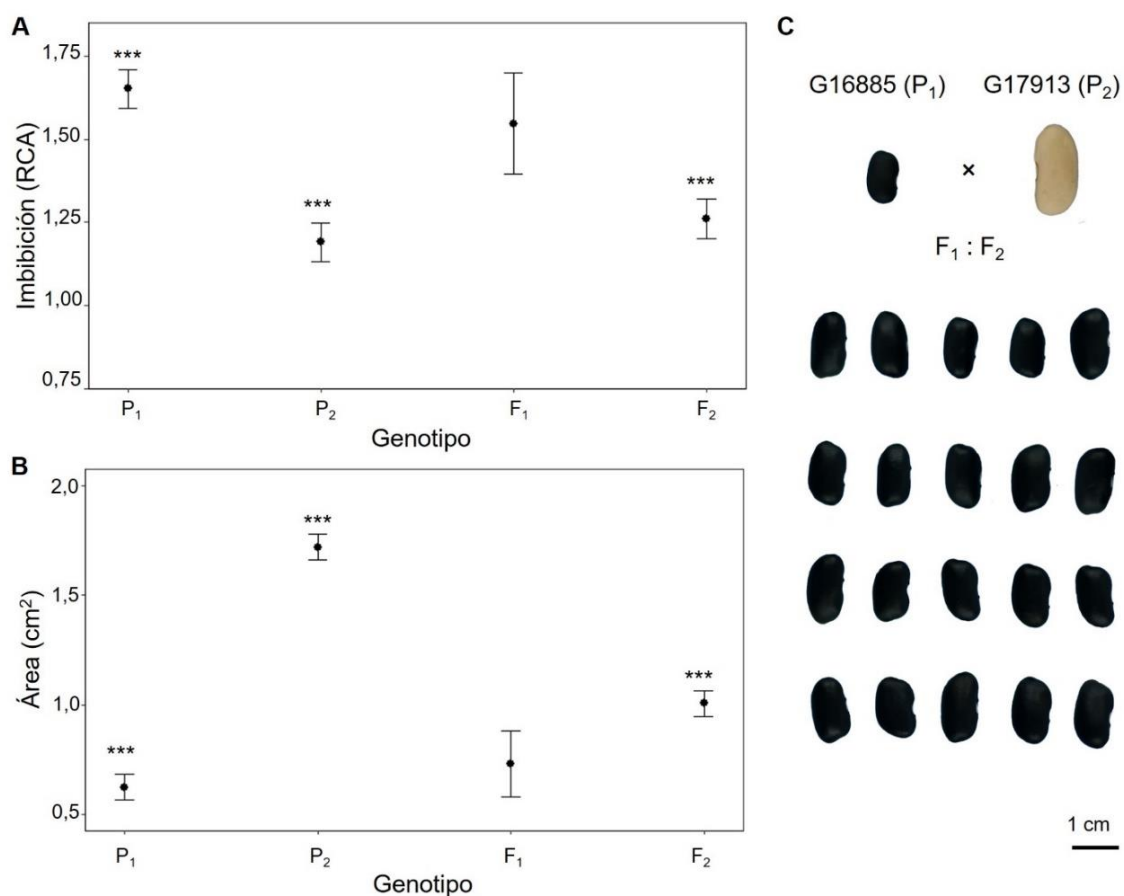


Figura 7. Análisis del fenotipo de imbibición y área de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) del cruzamiento entre accesiones G17913×G16885. A) Razón de crecimiento de la semilla (RCA): área total/área inicial. B) Tamaño de las semillas. C) Parental receptor de polen (P₁, G16885), parental donador de polen (P₂, G17913), generación filial 1 (F₁), generación filial 2 autofecundada (F₂), semillas F₂ provenientes de plantas F₁ (F₁:F₂). Los puntos indican los promedios y las barras el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas: $p = <0,001$ *** acorde a una distribución t de Wald.

Los histogramas de frecuencias de imbibición y área de 16 líneas de la generación F_3 del cruzamiento G17913xG16885, evaluados dos veces, permitió obtener nueve intervalos de clase para imbibición y 21 intervalos de clase para el área (Figura 8). La dispersión de los datos de imbibición fue desde 1,0 a 1,8, los picos más altos ocurren entre 1,4 a 1,6 (Figura 8A). En relación con el área de las semillas, la dispersión de los datos va desde 0,5 a 2,0 cm^2 (Figura 8B). En cuanto al color de las semillas se clasificaron en siete grupos (Figura 8C).

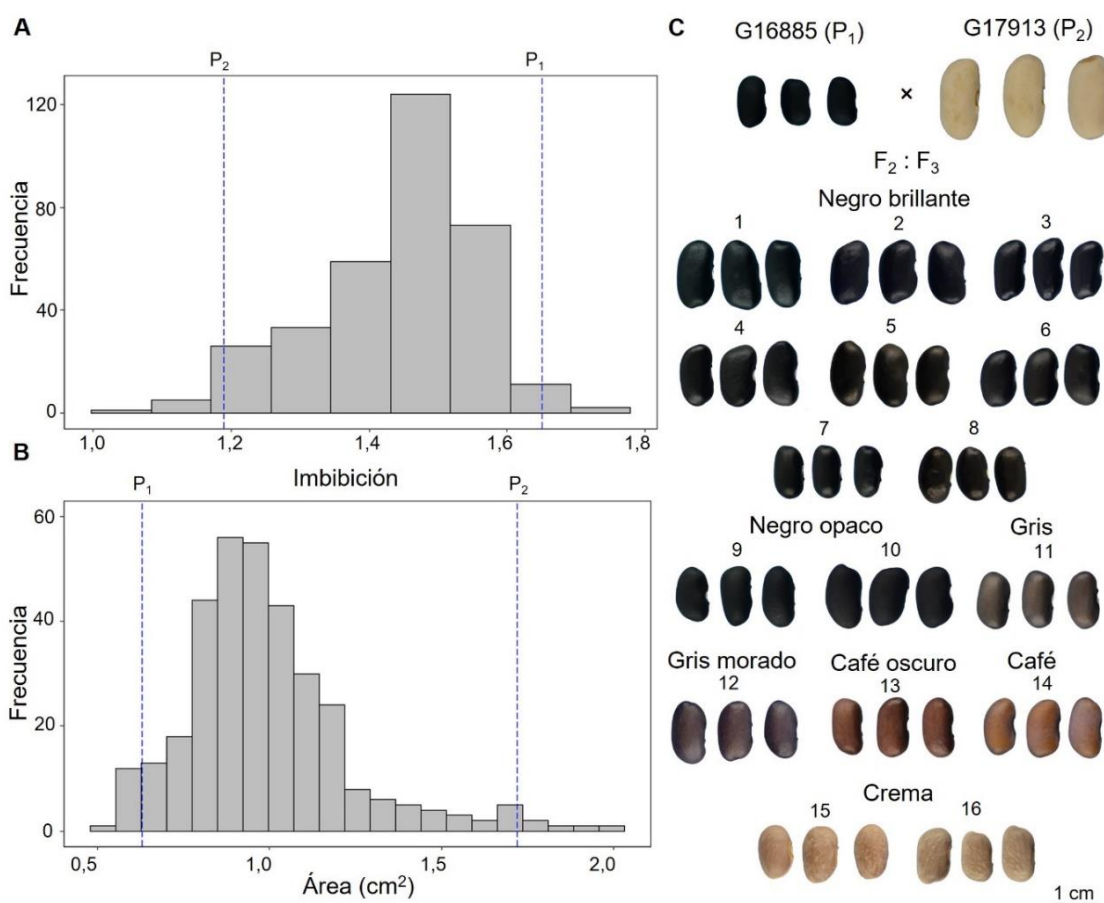


Figura 8. Histograma de frecuencias de imbibición y área de semillas de plantas F_3 de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) del cruzamiento entre accesiones G16885xG17913. A) Frecuencias de imbibición para 9 grupos de intervalos de clase, la línea punteada indica la media de $P_1 = 1,65$ y $P_2 = 1,19$. B) Frecuencias de área para 21 grupos de intervalos de clase, la línea punteada indica el promedio de $P_1 = 0,63$ y $P_2 = 1,72$. C) Parental receptor de polen (P_1 , G16885), parental donador de polen (P_2 , G17913) y semillas F_3 provenientes de plantas de la generación filial 2 ($F_2:F_3$). Los números del 1 al 16 indican las líneas obtenidas en la F_3 , $n = 334$.

La distribución de los datos de imbibición y área de las semillas F_3 de las 16 líneas del cruzamiento entre las accesiones G16885×G17913 muestra a los parentales en los extremos (Figura 9). El parental G16885 (alta imbibición) presentó una tasa de imbibición promedio de 1,65 y un área de 0,63 cm^2 (Figuras 9A y 9B). El parental G17913 (baja imbibición) tuvo una imbibición de 1,19 y un área de 1,72 cm^2 (Figura 9A y 9B).

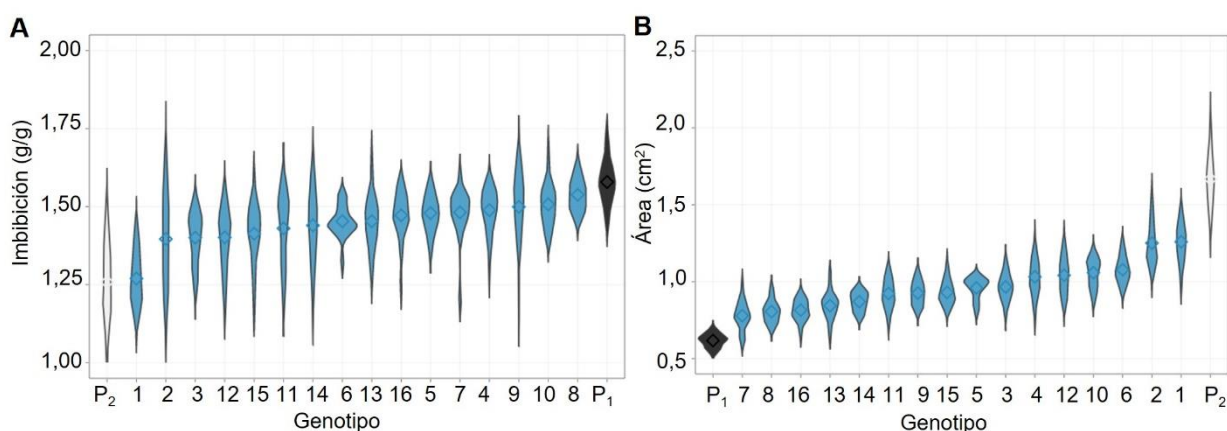


Figura 9. Fenotipo de imbibición y área de semillas F_3 de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) del cruzamiento entre accesiones G16885×G17913. A) Imbibición: peso total/peso inicial. B) Tamaño de las semillas (cm^2). Parental receptor de polen (P1, G16885), parental donador de polen (P2, G17913), los números del 1 al 16 indican las líneas obtenidas en la F_3 . Los violines muestran la distribución de los datos ($n = 334$).

Con los datos de imbibición de los parentales y los cruzamientos de la generación F_1 , F_2 y F_3 se ajustaron modelos lineales generalizados (Cuadro 10). Los modelos ajustados para los parentales y F_2 indican que las variables genotipo y área de la semilla (cm^2) influyen en la tasa de absorción de agua. El valor de importancia para los predictores del modelo (Cuadro 10) indica que el tamaño de la semilla tiene mayor influencia en la imbibición. La relación entre el tamaño de semilla y la tasa de imbibición es negativa, ya que, al aumentar el tamaño de la semilla, la RCA disminuye 0,35 (95%IC, -0,42-0,27) en los parentales (Figura 10A) y 0,41 (95%IC, 0,55-0,27) en las F_2 (Figura 10B). En la generación F_3 el tamaño de la semilla (cm^2) no influyó en la tasa de absorción del agua (Cuadro 10).

Cuadro 10. Parámetros de los modelos lineales generalizados ajustados en los parentales y generaciones F₁, F₂ y F₃ de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

No.	Modelo	AIC ^a	Exactitud (%)	n	Variable con mayor importancia	Valor de importancia
1	Parentales Imbibición = genotipo + área	-675,73	67,05	888	Área	9,56
2	Líneas F ₁ Imbibición = genotipo	-86,33	84,75	44	G16885×G16130 G16885×G11007 G17913×G16885	13,15 10,02 9,51
3	Líneas F ₂ Imbibición = genotipo + área	-324,4	67,64	197	Área	5,78
4	Líneas F ₃ Imbibición = genotipo	-598,1	53,95	296	Línea 4 Línea 10 Línea 9	8,86 8,65 8,48

^aAIC: Criterio de información de Akaike.

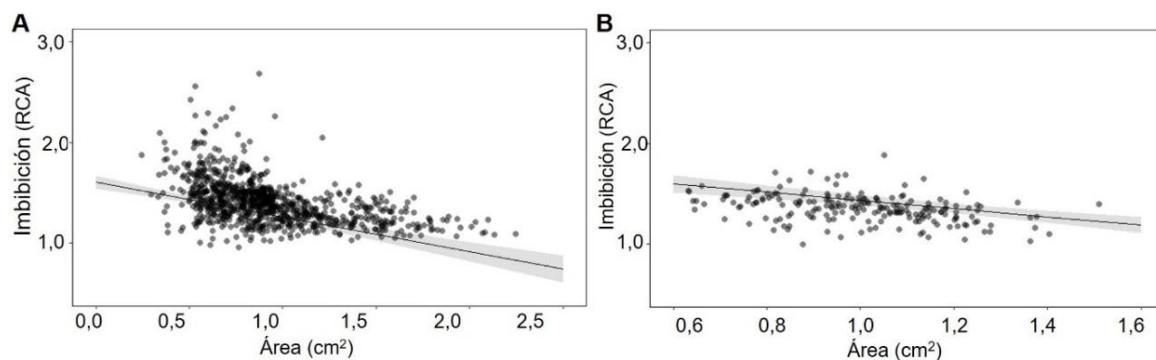


Figura 10. Relación entre la imbibición y área de la semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). A) Parentales, n=888 y B) F₂, n=197. Razón de crecimiento de la semilla (RCA) a 20 horas de imbibición: área total/área inicial, $p < 0,001$ (distribución t de Wald). El área gris representa el 95% de intervalo de confianza.

5.1.4 Verificación de cruzamientos

La verificación de las poblaciones F_1 se hizo con marcadores moleculares. Los marcadores BM139 y BM172 lograron distinguir las líneas parentales. Las generaciones F_1 provenientes de cruzamientos entre genotipos de alta imbibición por baja imbibición (G11378xG17913 y G16885xG17913) fueron parecidos a sus parental P_1 (Figura 11).

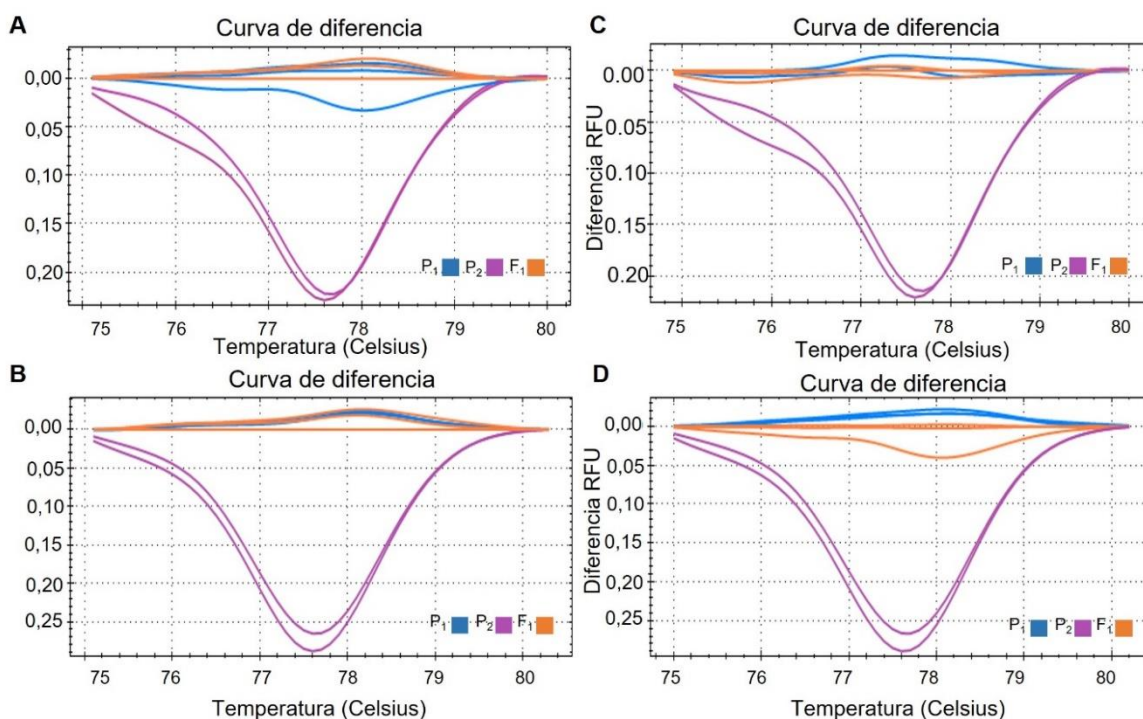


Figura 11. Curvas de fusión de las cruza de genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de baja imbibición por alta imbibición de semillas. A) Cruza G11378xG17913, marcador BM139; B) Cruza G11378xG17913, marcador BM172; C) Cruza G16885xG17913, marcador BM 139 y D) Cruza G16885xG17913, marcador BM 172. RFU: unidades de fluorescencia relativa. P_1 : genotipo receptor de polen y P_2 : genotipo donador polen y F_1 : cruzamiento entre $P_1 \times P_2$.

Las generaciones F_1 provenientes de cruzamientos entre genotipos de baja por mediana (G17913xG11317), y entre genotipos de baja por alta (G17913xG10962) imbibición fueron parecidos a los parentales P_2 (Figura 12). Los marcadores fueron dominantes en los cuatro cruzamientos evaluados.

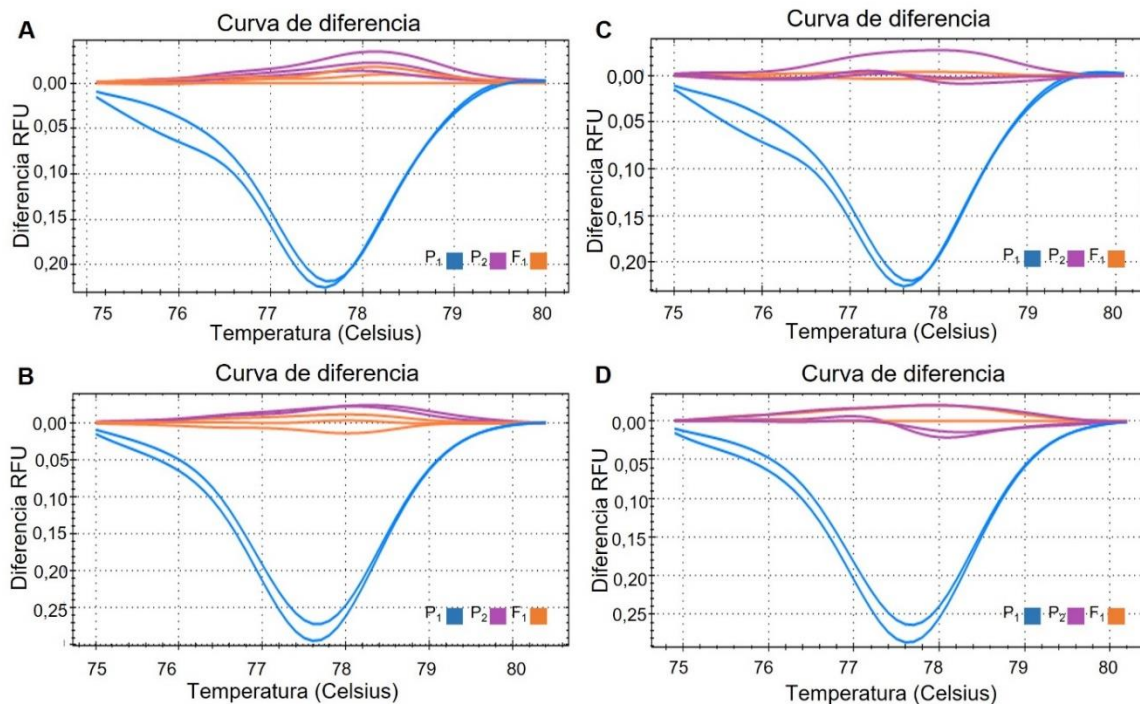


Figura 12. Curvas de fusión de las cruza de genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de alta imbibición por baja imbibición de semillas. A) Cruza G17913×G11317, marcador BM139; B) Cruza G17913×G11317, marcador BM172; C) Cruza G17913×G10962, marcador BM 139 y D) Cruza G17913×G10962, marcador BM 172. RFU: unidades de fluorescencia relativa. P₁: genotipo receptor de polen y P₂: genotipo donador de polen y F₁: cruzamiento entre P₁×P₂.

5.2 Identificación de genes involucrados en el proceso de imbibición

El análisis de transcriptoma se realizó para estudiar primero el efecto del genotipo (G16885-alta y G17913-baja), y segundo el efecto del tiempo (G16885: 1 hora y 6 horas) en la imbibición. El número de secuencia fue entre 21 a 24 millones de lecturas por muestra, todas de 150 pb (pares de bases), con una cobertura mínima de 117x (respecto al transcriptoma de referencia).

Los genes expresados diferencialmente para el efecto de los genotipos de baja y alta imbibición fueron un total de 6812 a la primera hora de imbibición (Cuadro 11). En el efecto del tiempo (1 hora y 6 horas de imbibición) se expresaron diferencialmente un total 100 genes en el genotipo (G16885) de alta imbibición (Cuadro 11).

Cuadro 11. Genes expresados diferencialmente en la fase de imbibición de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L).

Clasificación	Número de genes
Efecto del genotipo de alta (G16885) y baja (G17913) imbibición	
Genes expresados diferencialmente	6812
Sobre expresados	3270
Suprimidos	3545
Efecto del tiempo a 1 hora y 6 horas de imbibición del genotipo G16885	
Genes expresados diferencialmente	100
Sobre expresados	39
Suprimidos	61

El análisis de componentes principales separó los genotipos de alta (G16885) y baja (G17913) imbibición, que muestra un efecto significativo en las vías de los genotipos a la primera hora de imbibición (Figura 13A). Los dos primeros componentes explican el 92 por ciento de la varianza (Figura 13A). Por otro lado, el análisis de componentes principales a la primera y sexta hora de imbibición en el genotipo G16885 (alta imbibición) explica el 66 por ciento de los datos (Figura 13B).

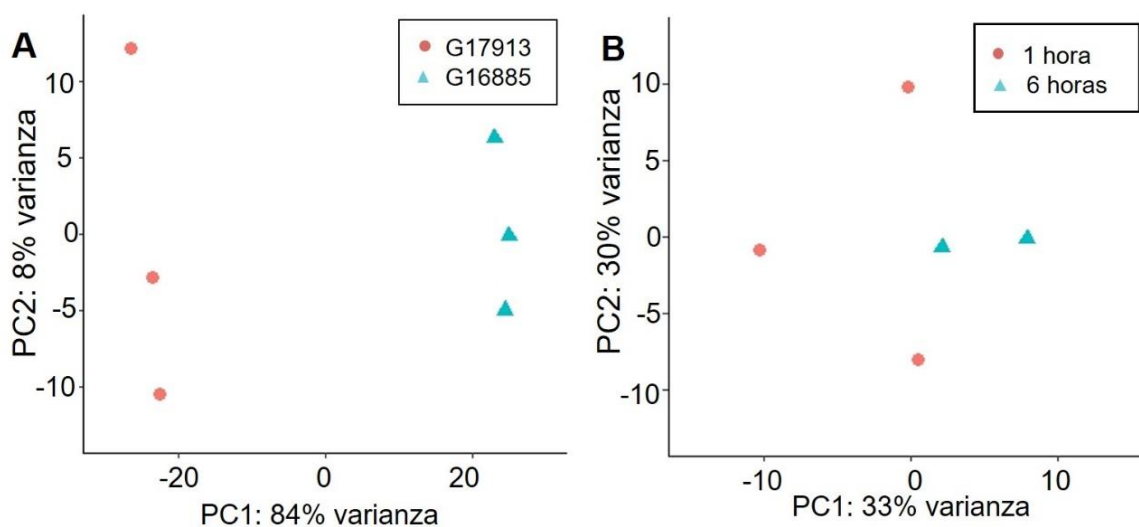


Figura 13. Análisis de componentes principales en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) al momento de la imbibición. A) Separación de genotipos G17913 y G16885 a la primera hora de imbibición. B) Separación de tiempo de Imbibición a 1 hora y 6 horas en genotipo G16885.

5.2.1 Expresión diferencial de genes entre genotipos de alta y baja imbibición

La expresión diferencial de los 6812 genes entre los genotipos G16885 (alta imbibición) y G17913 (baja imbibición) a la primera hora de la imbibición de las semillas se observa en el mapa de calor (Figura 14). Las subcategorías muestran la jerarquía con los niveles de expresión de genes individuales con TDF menor a 0,05 (Figura 14).

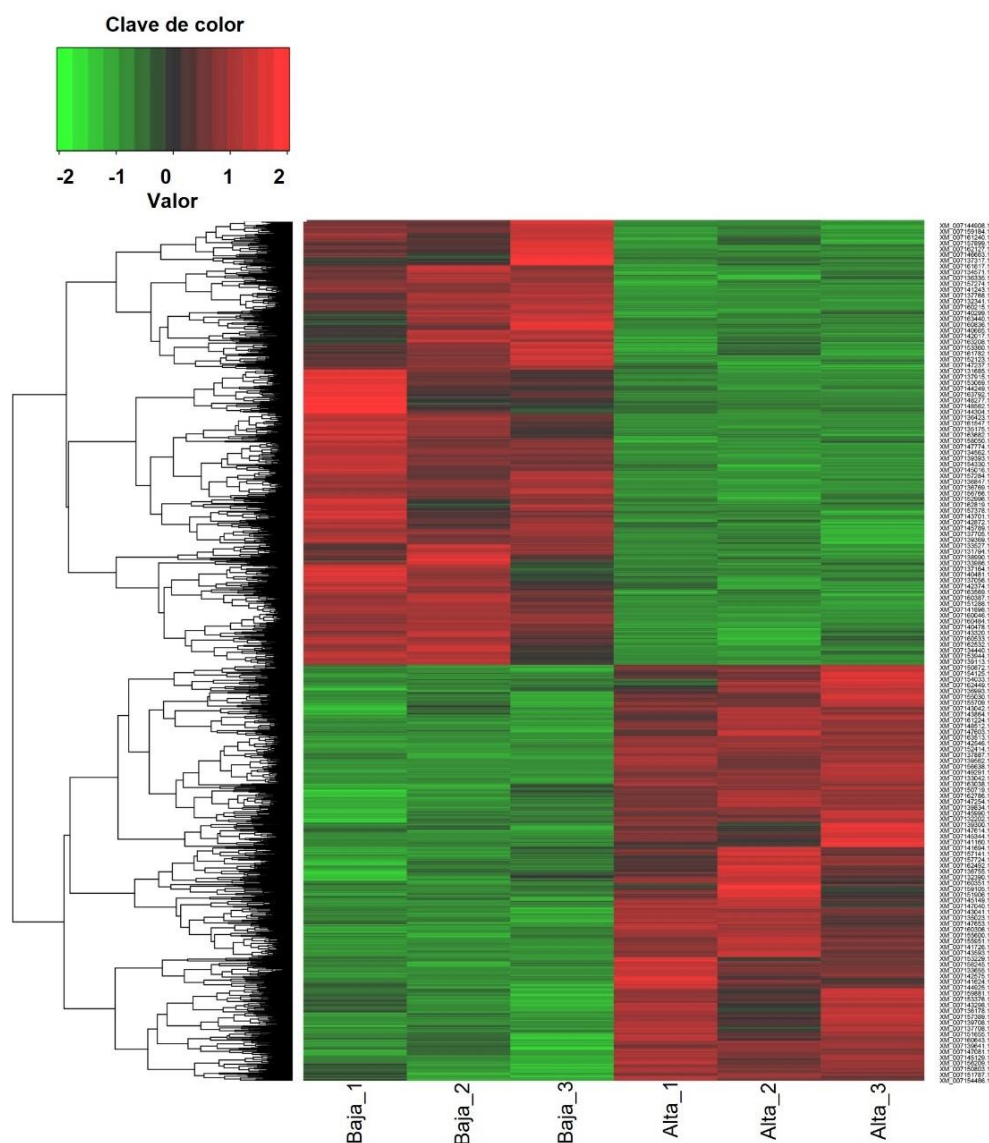


Figura 14. Mapa de calor de expresión diferencial de genes entre genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de alta y baja imbibición. Baja imbibición: G17913 y alta imbibición: G16885. El color verde agrupa en función de los valores de expresión suprimidos y color rojo agrupa en función de valores de sobreexpresión.

Los 25 genes expresados diferencialmente con los menores valores de p son proteínas hipotéticas que están asociadas a actividad catalítica, función molecular, componente celular y procesos biológicos (Cuadro 12). Los alineamientos de 24 proteínas hipotéticas tienen mayor parecido (% de identidad y e-valor) con secuencias de la soya (*Glycine max*) y una proteína de *Arabidopsis thaliana* (Cuadro 12). En el genotipo de baja imbibición (G17913) se encontraron 13 genes sobre expresados, que se relacionan con funciones moleculares, procesos biológicos, actividad catalítica y como parte de componentes celulares (Cuadro 12). Por otro lado, 12 genes estuvieron sobre expresados en el genotipo de alta imbibición (G16885), que están relacionados con funciones moleculares, procesos biológicos y componentes celulares (Cuadro 12).

Cuadro 12. Lista de genes expresados diferencialmente entre genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de alta y baja imbibición.

ID del gen	Ortólogo	Tasa de expresión diferencial	Identidad	e-valor	Fenotipo de imbibición
XM_007146449.1	Enzima ramificadora 1,4-alfa-glucano	0,017	89,32% ^a	0,0	Baja
XM_007163236.1	ATP-citrato sintasa cadena alfa proteína 2 isoforma X2	0,003	94,33% ^a	0,0	Baja
XM_007138711.1	Aparato de importación de proteínas en el cloroplasto isoforma X2	0,012	56,41% ^a	3,0E-80	Baja
XM_007148929.1	Complejo asociado a polipéptidos similar a la subunidad beta	0,018	93,08% ^a	1,0E-104	Baja
XM_007137683.1	Proteína putativa de choque térmico de clase I	0,087	85,62% ^a	2,0E-96	Baja
XM_007153679.1	Nucleorredoxina 1	7,609	83,25% ^a	0,0	Alta
XM_007146276.1	Callosa sintasa 7	13,143	89,63% ^a	0,0	Alta
XM_007137884.1	Deshidrogenasa de gliceraldehido-3-fosfato	0,003	94,20% ^a	4,0E-139	Baja
XM_007142288.1	Sintaxina-51	12,394	88,79% ^a	6,0E-154	Alta
XM_007163740.1	Florentina 4'-O-glucosiltransferasa	24,403	76,11% ^a	0,0	Alta
XM_007139434.1	Beta-amirina 28-monooxigenasa	0,035	72,04% ^a	0,0	Baja
XM_007153300.1	Isoforma beta de la subunidad A de la serina/treonina-proteína fosfatasa 2A	36,399	95,57% ^a	0,0	Alta

XM_007141587.1	1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa	0,060	84,79% ^a	0,0	Baja
XM_007150334.1	Transportador de zinc ZTP29	22,917	95,65% ^a	0,0	Alta
XM_007140663.1	Proteína ribosomal 40S S6	6,579	97,97% ^a	3,0E-176	Alta
XM_007148930.1	Polipéptido asociado al complejo tipo beta	172,121	93,08% ^a	1,0E-104	Alta
XM_007162731.1	Acuaporina TIP1-8	6,022	92,80% ^a	8,0E-165	Alta
XM_007148470.1	Miembro 1 de la superfamilia transmembrana 9	0,151	95,60% ^a	0,0	Baja
XM_007163778.1	(RS)-norcochlorina 6-O-tipo-metiltransferasa	0,019	73,50% ^a	0,0	Baja
XM_007133499.1	Putativa 12-tipo-oxofitodienoato reductasa 11	82,708	80,78% ^a	0,0	Alta
XM_007134210.1	Proteína ribosomal 40S S17-4	14,173	92,59% ^a	7,0E-91	Alta
XM_007143482.1	Familia de proteínas ribosómicas S13/S18	0,151	96,05% ^b	2,0E-107	Baja
XM_007160204.1	Fosfofructoquinasa 7 dependiente de ATP-6	0,012	94,48% ^a	0,0	Baja
XM_007142262.1	Aspartato carbamoiltransferasa 1, isoforma X2	27,078	93,35% ^a	0,0	Alta
XM_007152961.1	Proteína que contiene el dominio de desaminasa DYW	0,028	92,77% ^a	0,0	Baja

^a Ortólogo de *Glycine max* ^b Ortólogo de *Arabidopsis thaliana*, ^c Tratamiento: alta imbibición accesión G16885 y baja imbibición G17913.

5.2.2 Expresión diferencial de genes a la primera y sexta hora de imbibición

La expresión diferencial de 100 genes se observa en el mapa de calor (Figura 15). Las subcategorías muestran que los genes sobre expresados a la primera hora se encontraban suprimidos a la sexta hora de iniciada la imbibición. Las subcategorías muestran la jerarquía con los niveles de expresión de genes individuales con TDF menor a 0,05 (Figura 15).

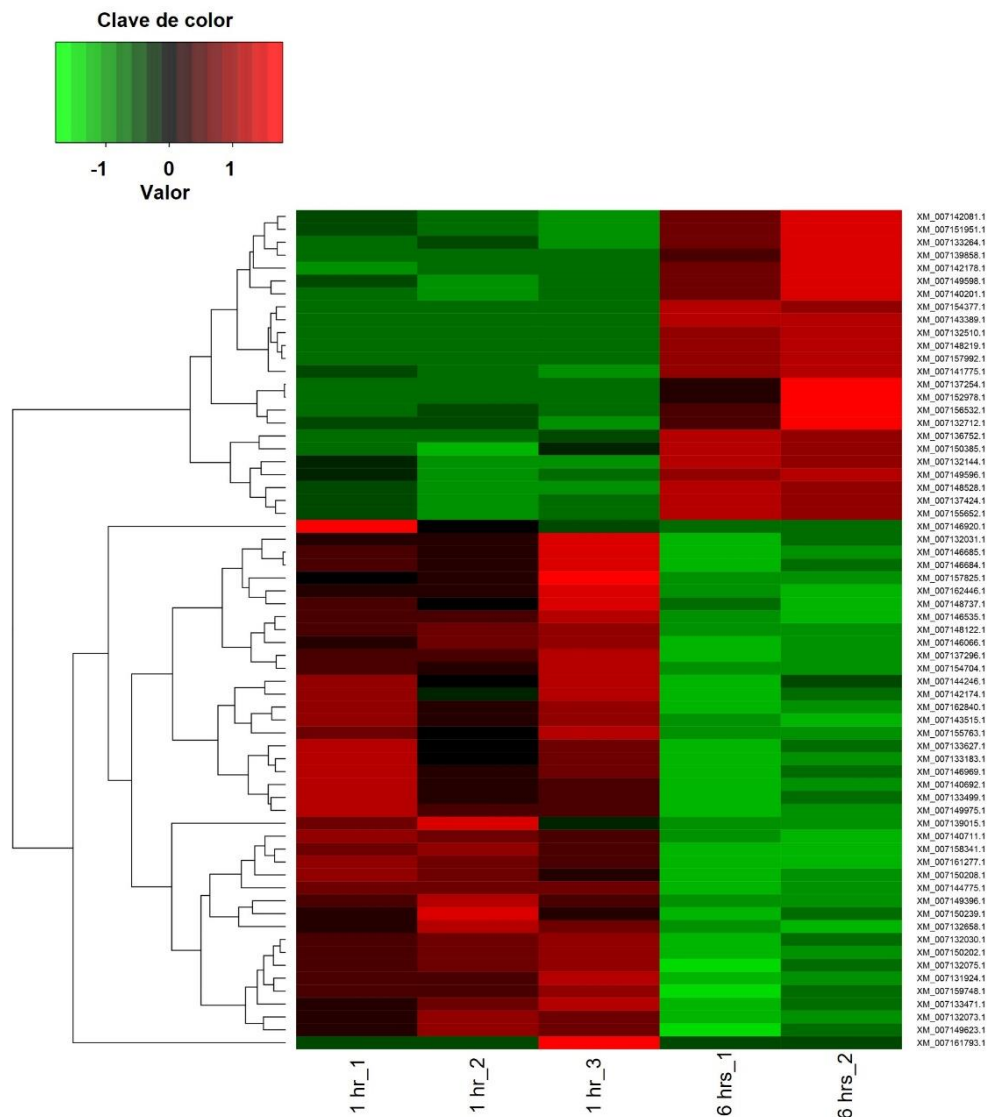


Figura 15. Mapa de calor de expresión diferencial de genes a la primera y sexta hora de imbibición en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Genotipo G16885. El color verde agrupa en función de los valores de expresión suprimidos y color rojo agrupa en función de valores de sobreexpresión.

Los 25 genes expresados diferencialmente con los menores valores de p son proteínas hipotéticas que están asociadas a actividad catalítica, función molecular, componente celular y procesos biológicos (Cuadro 13). Los alineamientos de las 25 proteínas hipotéticas tienen mayor parecido (% de identidad y e-valor) con secuencias de la soya (*Glycine max*), dos con *Arabidopsis thaliana* y tres no hay coincidencia con secuencias de otro organismo (Cuadro 13).

Cuadro 13. Lista de genes expresados diferencialmente a la primera y sexta hora de imbibición en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

ID gene	Ortólogo	Tasa de expresión diferencial	Identidad (%)	e-valor	Tiempo de imbibición ^d
XM_007140201.1	Proteína sin caracterizar	2,405	NC ^a	- - -	6 horas
XM_007154704.1	Histona H4	0,455	100,00 ^b	9,0E-68	1 hora
XM_007144775.1	Histona H1	0,477	82,73 ^b	1,0E-46	1 hora
XM_007133264.1	Alfa,alfa-trehalosa-fosfato sintasa (formadora de UDP)	4,688	90,17 ^b	0,0	6 horas
XM_007131924.1	Proteína de la superfamilia de las histonas	0,410	99,26 ^c	2,0E-94	1 hora
XM_007132073.1	Histona H4	0,409	100,00 ^b	1,0E-67	1 hora
XM_007132510.1	Proteína que contiene dominio tipo C3H1	3,262	82,97 ^b	0,0	6 horas
XM_007150202.1	Histona H4	0,594	100,00 ^b	9,0E-68	1 hora
XM_007146684.1	Histona H4	0,404	100,00 ^b	9,0E-68	1 hora
XM_007162840.1	Cadena pequeña de ribonucleósido-difosfato reductasa	0,633	93,62 ^b	0,0	1 hora
XM_007132030.1	Proteína de la superfamilia de las histonas	0,456	97,97 ^b	3,0E-98	1 hora
XM_007139858.1	Proteína que contiene el dominio SPX y EXS	7,166	93,10 ^b	0,0	6 horas
XM_007149598.1	Proteína secretora	1,717	NC ^a	- - -	6 horas
XM_007156532.1	Proteína que contiene el dominio ERCC4	2,231	89,87 ^b	0,0	6 horas
XM_007150208.1	Proteína que contiene el dominio NOT2_3_5	0,033	93,15 ^b	0,0	1 hora
XM_007132658.1	Proteína que contiene el dominio proteína quinasa	0,420	89,27 ^b	0,0	1 hora
XM_007133471.1	Proteína de la superfamilia de las histonas	0,439	99,26 ^b	2,0E-94	1 hora
XM_007140711.1	Hidroquinona glicosiltransferasa	0,642	85,65 ^b	0,0	1 hora
XM_007150385.1	Proteína sin caracterizar	2,104	NC ^a	- - -	6 horas
XM_007162446.1	Similar a un dominio de homología del locus de floración K	0,456	87,74 ^b	0,0	1 hora
XM_007137254.1	Proteína que contiene dominio tipo PHD	170,711	81,08 ^b	0,0	6 horas
XM_007148528.1	Dedo de zinc CCCH que contiene dominio proteína 5 isoforma X1	1,502	72,66 ^b	0,0	6 horas
XM_007157992.1	Proteína tipo quinasa KIN-14l isoforma X2	144,094	94,96 ^b	0,0	6 horas
XM_007152978.1	Proteína que contiene el dominio NB-ARC	158,679	75,94 ^b	0,0	6 horas
XM_007132075.1	Histona 4	0,458	100,00 ^b	9,0E-68	1 hora

^a No coincidencia, ^b Ortólogo de *Glycine max*, ^c Ortólogo de *Arabidopsis thaliana*, ^d

Tratamiento: 1 hora y 6 horas de imbibición de accesión G16885.

5.2.3 Análisis del gen *pectina acetiltransferasa 8 (PAE-8)*

Para el análisis del gen *pectina acetiltransferasa 8* se utilizaron dos genotipos control (G4780 con el alelo funcional y G1375 con el alelo no funcional), reportados por Soltani et al. (2021). Los controles fueron accesiones pertenecientes a la colección de CIAT, pero no fueron parte de las evaluaciones. La amplificación de la secuencia del gen *PAE-8* se realizó con los imprimadores Pv3-40634091 (Cuadro 5), reportados por Soltani et al. (2021). Los autores indican que estos imprimadores amplifican el fragmento que abarca el séptimo exón del cromosoma 3 donde se reporta la inserción de 5 pares de bases (pb). Las secuencias de los controles fueron alineadas y no se encontraron diferencias en las secuencias en la región amplificada (Figura 16). Al realizar el BLAST tiene un 86% de identidad a una proteína hipotética (*Phavul_003G183200g*) y no a la proteína *PAE-8 (Phvul.003G277600)*, reportada por Soltani et al., (2021) (Figura 17). Por lo tanto, los imprimadores Pv3-40634091 no logran amplificar el fragmento de interés.

	5	15	25	35	45	55
G1375	TTCGCTTCAA	GGGATGAAAG	TTATGGCATT	ACCCTCTGTT	TGATTCAGAC	AAAAAGACAA
G4780	TTCGCTTCAA	GGGATGAAAG	TTATGGCATT	ACCCTCTGTT	TGATTCAGAC	AAAAAGACAA
	65	75	85	95	105	115
G1375	GGGAAGAGGA	AAACAAATTG	TAATATGAAA	AAGGAAGAAA	GAGTTTTGAT	TTTCTTCCCT
G4780	GGGAAGAGGA	AAACAAATTG	TAATATGAAA	AAGGAAGAAA	GAGTTTTGAT	TTTCTTCCCT
	125	135	145	155	165	175
G1375	AATAAAGGTC	AAATTTTCTT	TTTCCCTTTA	ATTTTACTCA	ACCAAATAAA	AGAAAATGTG
G4780	AATAAAGGTC	AAATTTTCTT	TTTCCCTTTA	ATTTTACTCA	ACCAAATAAA	AGAAAATGTG
	185	195	205	215	225	235
G1375	TTATTATTTG	AATTTCTTTC	TACTATTGCT	AGTTAGTTAG	CATCCAAACT	TGTCTTACCT
G4780	TTATTATTTG	AATTTCTTTC	TACTATTGCT	AGTTAGTTAG	CATCCAAACT	TGTCTTACCT
	245	255	265			
G1375	ATTATGTTTT	GCAGCATTTT	AAACGGTG			
G4780	ATTATGTTTT	GCAGCATTTT	AAACGGTG			

Figura 16. Alineación de secuencias de genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). El genotipo G4780 tiene el alelo funcional y el G1375 el alelo no funcional (inserción 5pb).

Puntaje 228 bits (123)	Expectativa 3e-59	Identities 197/230 (86%)	Vacíos 15/230(6%)	Hebra Plus/Plus
Consulta 1	TTCGCTTCAAGGGATGAAAGTTATGGCATTACCCTCTGTTTGATTGATTGAGACAAAAAGACAA	60		
Sujeto 2248	TTCACCTCCACGGATGCAAGTTATGGCATTACCCTCTGTTTGATTGAGAGG-AAAGACGA	2306		
Consulta 61	GGGAAGAGGAAAACAAATTGTAA-T-AT--GAAAAAGGAAGAAAGAGTTTTGATTTTCTT	116		
Sujeto 2307	GGGAAGAGAGAAAGAAATTGCAAATTATATTGAAGAGGAAGAAAGAGTTTTGATTTTCTT	2366		
Consulta 117	CCCTAATAAAGGTCAAATTTCTTTTTCCCTTTAATTTTACTCAACCAAATAAAAGAAAA	176		
Sujeto 2367	TCC---TAAAGGTCAA-----TTTTCCCTTTAATTTTACTCAACCAAATAAAAGAAAA	2417		
Consulta 177	TGTGTTATTA-TTTGAATTTCTTTCTACTATTGCTAGTTAGTTAGCATCC	225		
Sujeto 2418	TGTGTTATTATTTTGAATTTCTTTCTACTGCTAGTTAGTTAGCATCC	2467		

Figura 17. Alineamiento de secuencia de G4780 al genoma de referencia de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

Lo anterior expuesto, condujo al diseño de imprimadores (Cuadro 6) para la amplificación de un fragmento de menor tamaño (150 pb), con el objetivo de validar con la técnica de PCR-HRM. Los marcadores diseñados fueron probados para verificar si lograban diferenciar entre G1375 y G4780, ya que la técnica de HRM, logra detectar el cambio de secuencias de ácidos nucleicos (Mader et al., 2011). El marcador PAE_indel_e7_F logró distinguir entre los controles: G4789 (alelo funcional) y G1375 (alelo no funcional) (Figura 18).

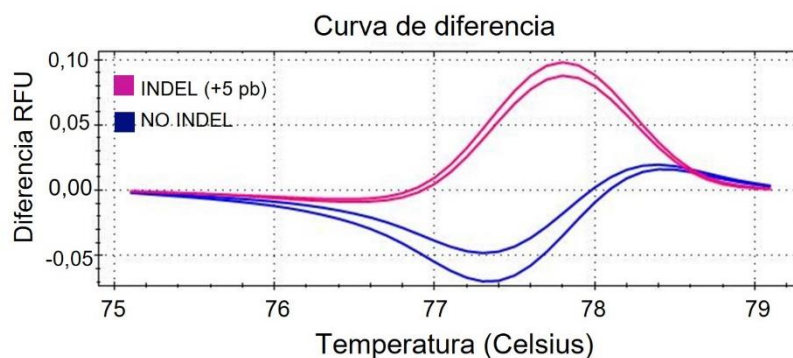


Figura 18. Curvas de fusión de genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con el alelo funcional (G4780) y alelo no funcional (G1375) del gen *pectina acetil esterasa 8*. RFU: unidades de fluorescencia relativa. INDEL inserción de 5pb, alelo no funcional. NO INDEL sin la inserción de 5pb, alelo funcional.

5.3 Diferencias morfológicas a nivel celular y microestructural en semillas

El eje embrionario está formado por las primeras hojas, hipocótilo, epicótilo y radícula (Figura 19A). Las mediciones del tamaño células se realizó en las células del parénquima medular del área de los cotiledones y en las células del eje embrionario en el área del hipocótilo (Figura 19 A y B).

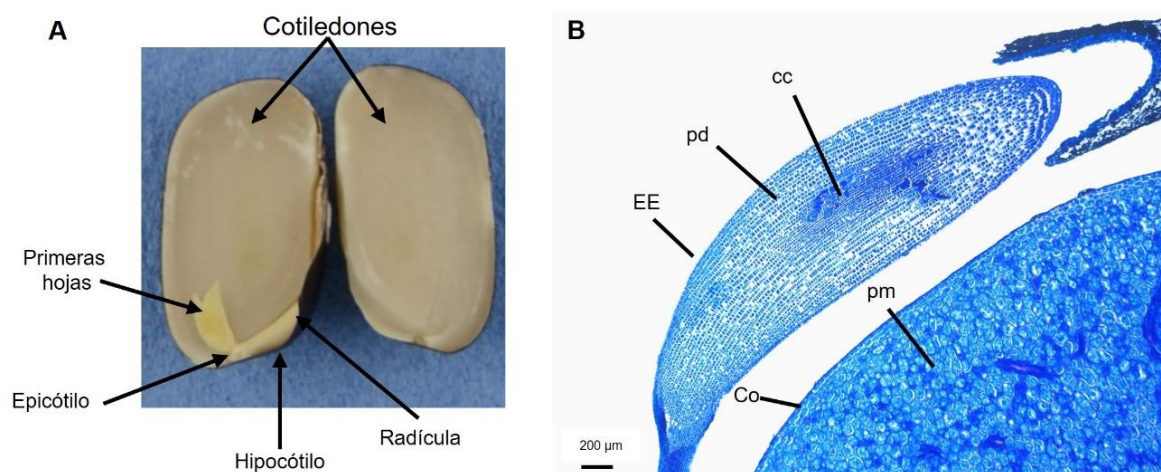


Figura 19. Estructura interna y anatómica de la semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). A) Imagen de la semilla. B) Sección longitudinal del cotiledón (Co) y eje embrionario (EE). Observaciones realizadas en pd: parénquima en división, cc: células del cilindro central y pm: parénquima medular. El corte fue teñido con azul de toluidina con un aumento de 4x.

A las 20 horas de iniciada la imbibición se encontraron diferencias en el tamaño de las células del parénquima medular entre las accesiones G17913 y G16130 con respecto a G16885, G11007, G12858A y G11787 ($p < 0,001$) (Figura 20A-F). Las células del parénquima medular de G17913 tienen $3994,29 \mu\text{m}^2$ con IC al 95% (2628,76-5359,82) y G16130 tienen $3163,1 \mu\text{m}^2$ con IC al 95% (1286,24-5040,98) más que G16885 (Figura 20A, 20C y 20D).

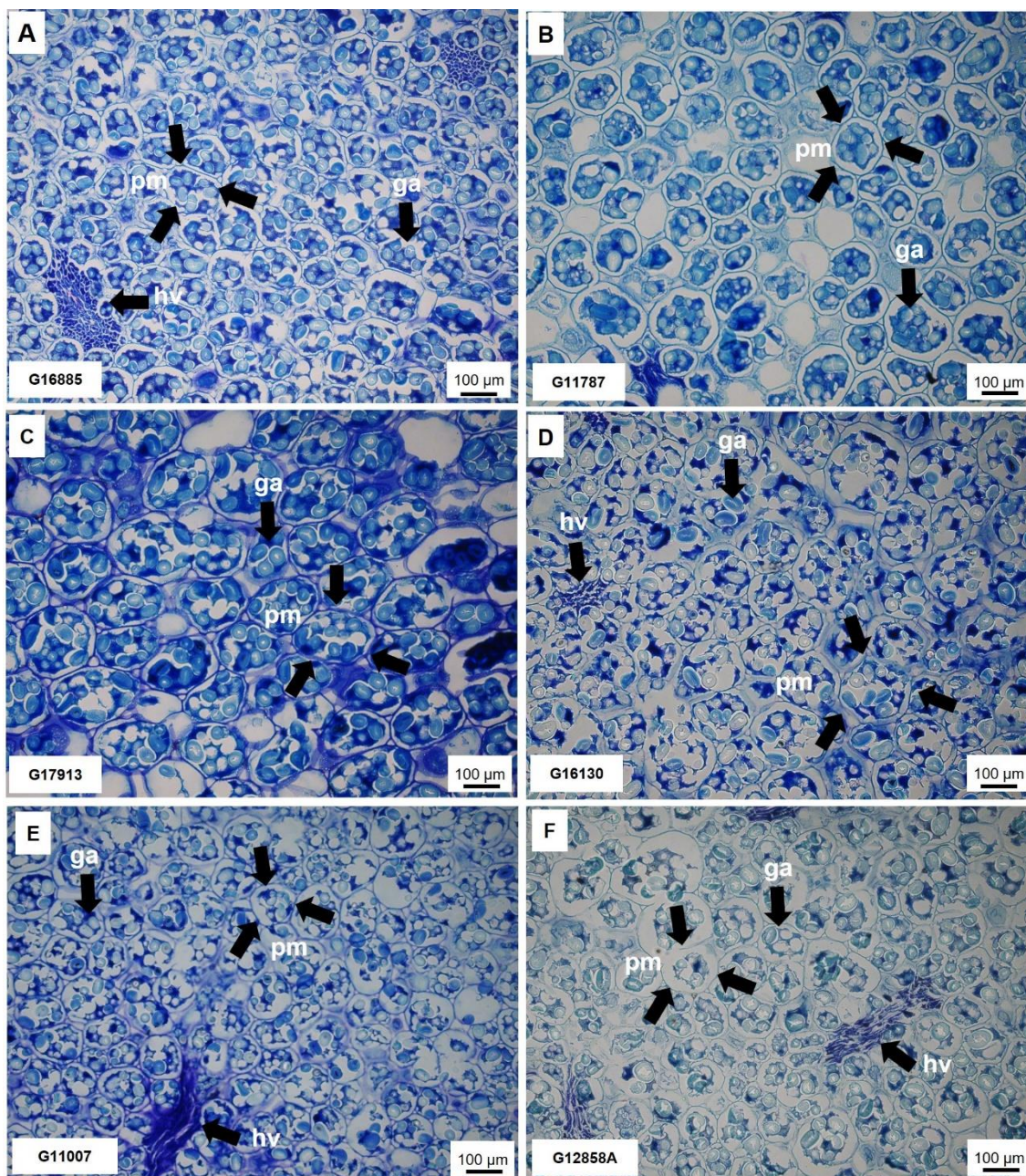


Figura 20. Diferencias en el tamaño de células del parénquima medular del cotiledón de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). A) Genotipo de alta imbibición G16885. B) Genotipo de mediana imbibición G11787 C, D, E y F) Genotipos de baja imbibición G17913, G16130, G11007 y G12858A. Las flechas señalan célula del parénquima medular (pm), gránulos de almidón (ga) y haces del sistema vascular (hv). Sección longitudinal de los cotiledones teñidos con azul de toluidina con un aumento de 20x.

En las células del parénquima del área del hipocótilo hubo diferencia con los genotipos G17913 y G16130 con respecto a G12858A (Cuadro 14). El genotipo

G16130 tiene 174,38 μm^2 más que G11787, que tiene una imbibición promedio de 1,5 y área de 0,91 cm^2 . No hubo diferencia significativa entre las áreas de las células del cilindro central del eje embrionario.

Cuadro 14. Análisis marginal de contrastes del tamaño de células del parénquima del área del hipocótilo de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

Nivel 1	Nivel 2	Diferencia	IC 95% ^a	SE ^b	p ^c
G11007	G11787	67,40	-51,95;186,75	40,10	0,546
G11007	G12858A	96,07	-23,28;215,42	40,10	0,163
G11787	G12858A	28,67	-90,68;148,02	40,10	0,980
G16130	G11007	106,98	-12,37;226,33	40,10	0,087
G16130	G11787	174,38	55,03;293,72	40,10	<0,001***
G16130	G12858A	203,05	83,70;322,39	40,10	<0,001***
G16885	G11007	-74,02	-193,37;45,33	40,10	0,439
G16885	G11787	-6,62	-125,97;112,73	40,10	>0,999
G16885	G12858A	22,05	-97,30;141,39	40,10	0,994
G16885	G16130	-181,00	-300,35; -61,65	40,10	<0,001***
G16885	G17913	-144,90	-264,25; -25,55	40,10	0,005**
G17913	G11007	70,88	-48,47;190,23	40,10	0,489
G17913	G11787	138,28	18,93;257,63	40,10	0,009*
G17913	G12858A	166,95	47,60;286,29	40,10	<0,001***
G17913	G16130	-36,10	-155,45;83,25	40,10	0,946

^aIC 95%: Intervalo de confianza al 95%; ^bSE: error estándar; ^cp: p-valor ajustado (Holm 1979).

Las observaciones microestructurales mediante microscopio electrónico de barrido en las semillas de frijol de los genotipos G16885 (alta imbibición) y G17913 (baja imbibición) mostraron diferencias en cuanto a la forma del micropilo y las microgrietas presentes en la lente (Figura 21). El micropilo en el genotipo de alta imbibición (G16885) tiene una forma de “Y” (Figura 21A), y en el genotipo de baja imbibición (G17913) es similar a una línea (Figura 21B). El área de las microgrietas fue mayor en el genotipo G16885 con un promedio de 68,86 μm^2 con IC al 95% (52,86-84,86) (Figura 21C y E). Por otro lado, el genotipo G17913 tuvo un área de 30,86 μm^2 con IC al 95% (24,09-38,63) (Figura 21D y F).

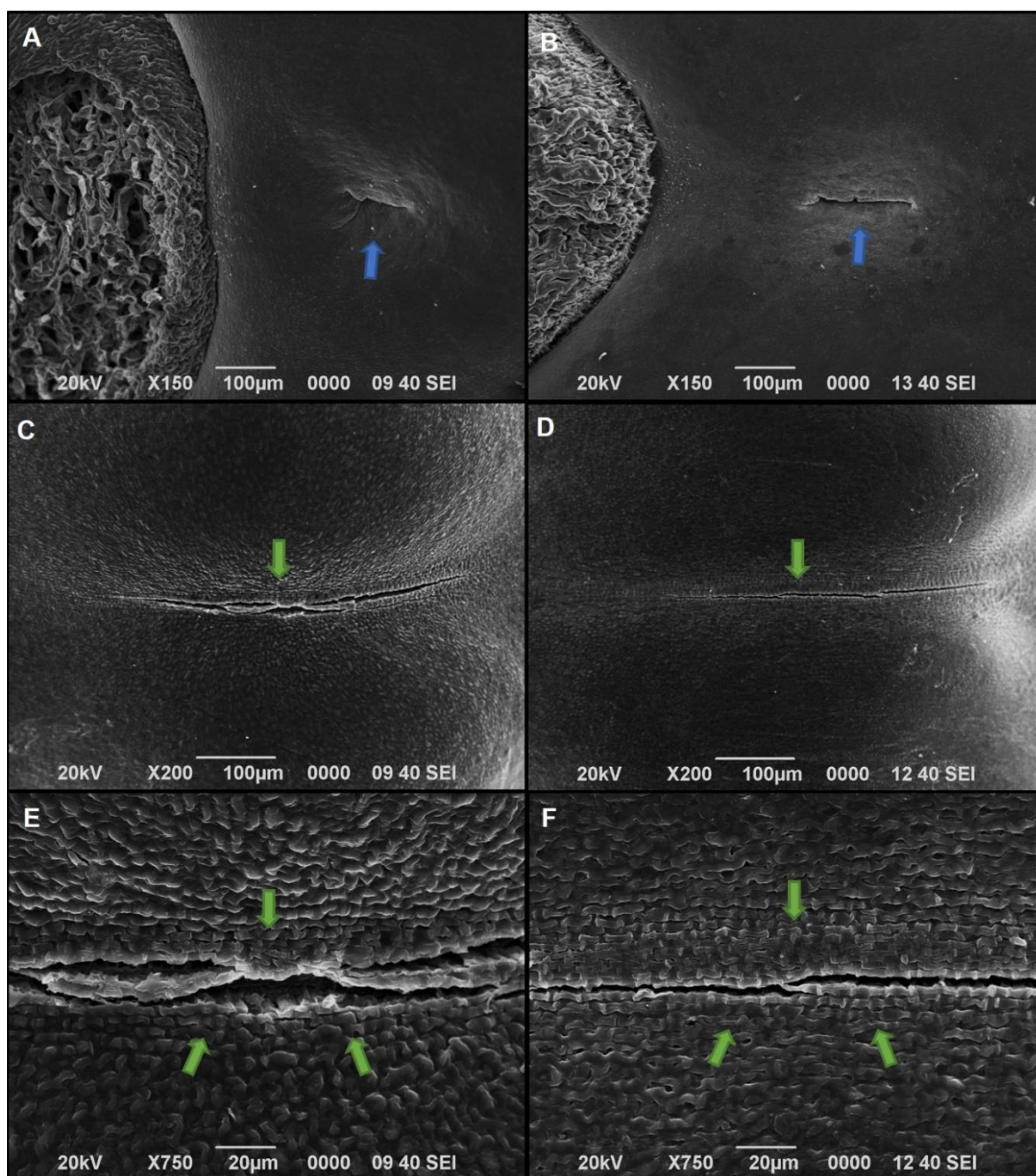


Figura 21. Diferencias en el área de la lente y micrópilo en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). A) Micrópilo de genotipo G16885. B) Micrópilo de genotipo G17913. C) Lente de genotipo G16885. D) Lente de genotipo G17913. E) Microgrietas en genotipo G16885. F) Microgrietas en genotipo G17913. Las flechas de los paneles A y B señalan el micrópilo y las flechas de los paneles C-F las microgrietas en el área de la lente.

5.4 Relación de la poca imbibición de agua con la capacidad de germinativa

La relación de la imbibición con la capacidad germinativa del frijol se evaluó en dos genotipos de baja imbibición G17913 y G11007, un genotipo de alta imbibición G16885 y un testigo comercial NAMBI. Se observó que el tratamiento -0,4MPa afectó la cantidad de agua absorbida por los genotipos G11007, G16885 y NAMBI (Figura 22). El genotipo G17913 en ambas condiciones embebió la misma cantidad de agua (Figura 22). Los genotipos NAMBI y G16885 fueron los de mayor tasa de imbibición y los genotipos G11007 y G17913 los de menos tasa de imbibición, consistente con las evaluaciones realizadas.

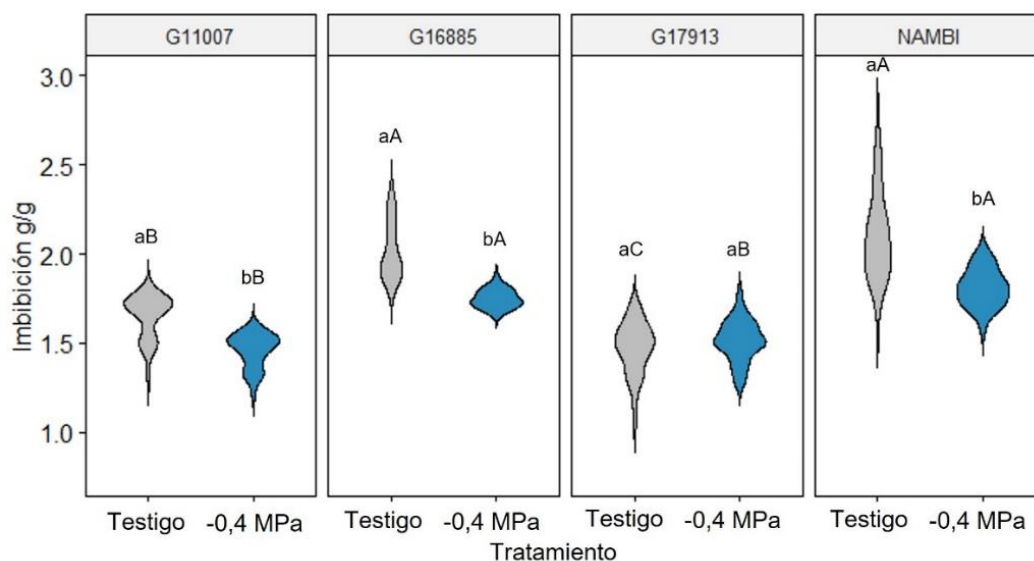


Figura 22. Análisis de imbibición en genotipo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de limitación de agua. Tratamientos: PEG6000 a -0,4 MPa y testigo (agua). La misma letra minúscula en los tratamientos y mayúsculas en los genotipos no difieren por Tukey ($p < 0,05$).

La germinación se vio afectada con el tratamiento -0,4 MPa en todos los genotipos evaluados (Figura 23A-D). Los genotipos de baja imbibición (G17913 y G11007) presentaron un retraso de 72 horas en la germinación (Figura 23B y D) con el tratamiento -0,4 MPa en comparación al tratamiento testigo. Con ambos tratamientos (testigo y -0,4 MPa) hubo un retraso de 24 a 48 horas en la germinación en los genotipos de baja imbibición (G17913 y G11007) con respecto a la variedad

NAMBI y el genotipo de alta imbibición (G16885), que iniciaron a germinar a las 24 horas (en agua) y 48 horas (en -0,4 MPa con PEG6000) (Figura 23A-D).

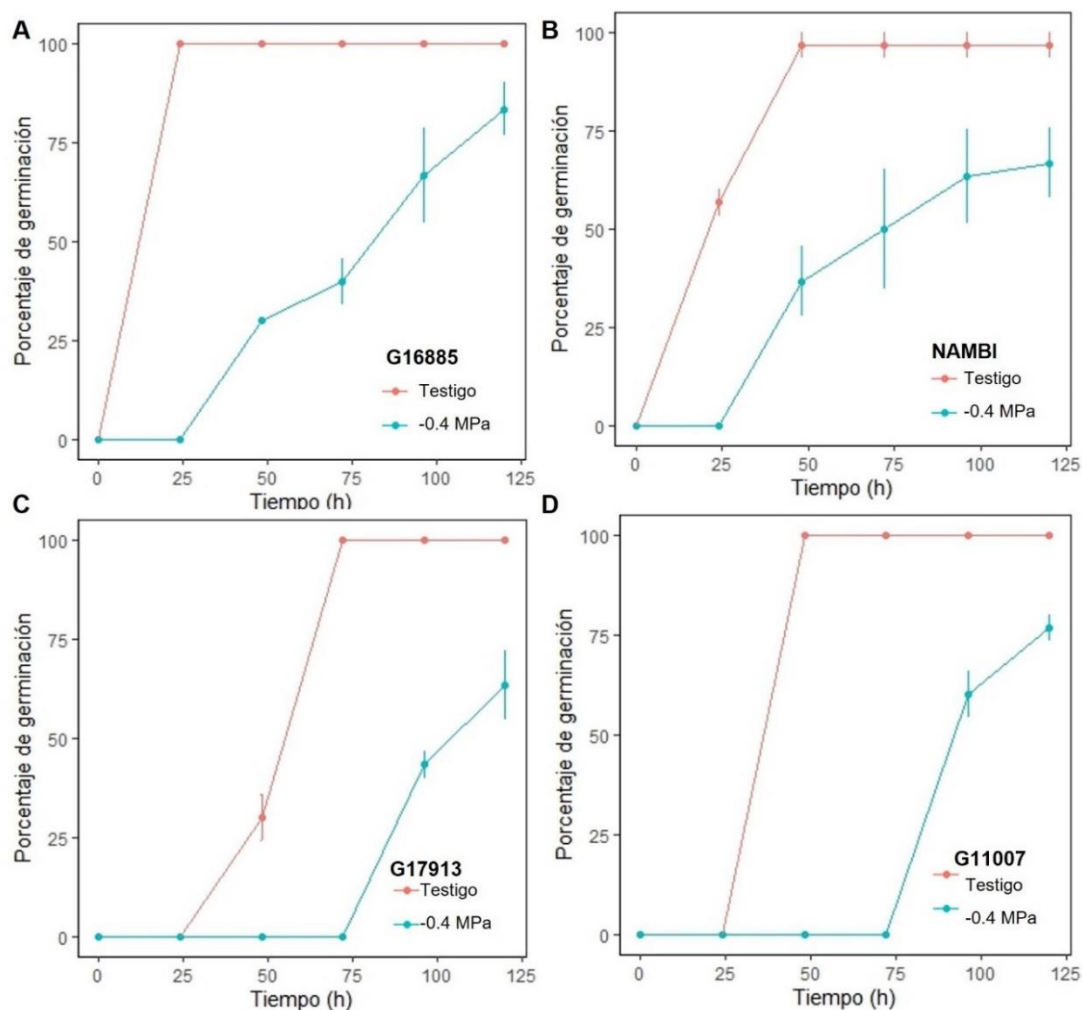


Figura 23. Curva de germinación de genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de baja y alta imbibición en condiciones de limitación de agua. A) Alta imbibición: G16885. B) Testigo comercial NAMBI. C y D) Baja imbibición: G17913 y G11007. Tratamientos: PEG6000 a -0,4 MPa y testigo (agua). Las barras indican el error estándar.

El análisis de comparación de medias de Kruskal-Wallis indica que el mayor porcentaje de germinación máxima se presentó en el tratamiento testigo (Figura 24). En el caso de los genotipos no hubo diferencia significativa (p-valor 0,807) entre los genotipos en ambos tratamientos.

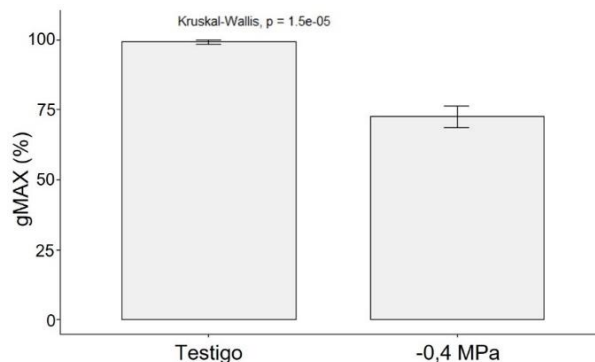


Figura 24. Germinación máxima genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de baja y alta imbibición bajo limitación de agua (PEG6000 a -0,4 MPa). Tratamientos: PEG6000 a -0,4 MPa y testigo (agua). Las barras indican el error estándar y p-valor = 1,5e-05.

En relación con el área bajo la curva de la germinación (AUC), hubo diferencia significativa entre tratamientos, siendo el tratamiento testigo que presentó las mayores AUC (Figura 25). Los genotipos G16885 y NAMBI con el tratamiento -0,4 MPa tuvieron una AUC de 42,6 y 44,2, respectivamente. Por otro lado, los genotipos de baja imbibición (G17913 y G11007) presentaron los valores más bajos de AUC de 16,6 y 21,3, respectivamente (Figura 25).

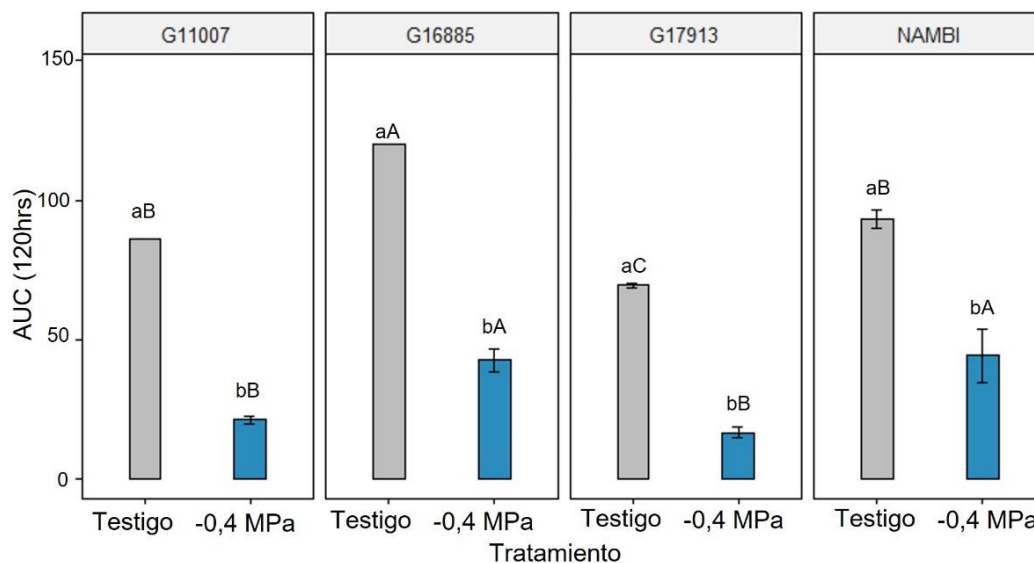


Figura 25. Área bajo la curva de la germinación (AUC) en genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de limitación de agua. Tratamientos: PEG6000 a -0,4 MPa y testigo (agua). Las barras indican el error estándar. La misma letra minúscula en los tratamientos y mayúsculas en los genotipos no difieren por Tukey ($p < 0,05$).

Los genotipos de baja imbibición (G11007 y G17913) presentaron los mayores valores de t50 en ambos tratamientos (Figura 26). El genotipo de imbibición alta 16885 con el tratamiento -0,04 MPa (PEG6000) les tomó 64,8 horas en alcanzar el 50 por ciento de la germinación mientras que a los genotipos G17913 y G11007 (baja imbibición) les tomo 93,5 y 92,1 horas, respectivamente.

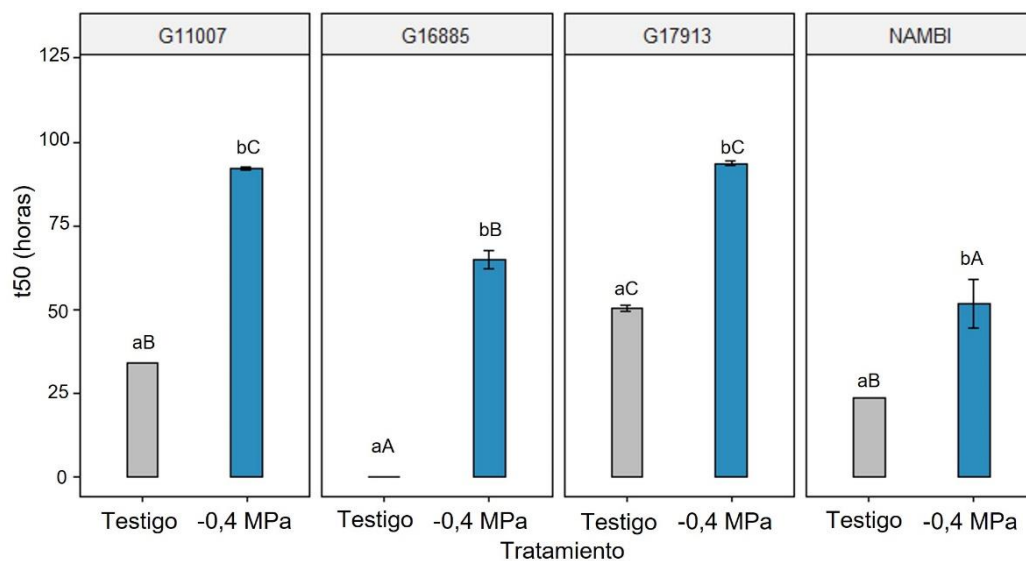


Figura 26. Tiempo para alcanzar el 50 por ciento de la germinación (t50) en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de limitación de agua. Tratamientos: PEG6000 a -0,4 MPa y testigo (agua). Las barras indican el error estándar. La misma letra minúscula en los tratamientos y mayúsculas en los genotipos no difieren por Tukey ($p < 0,05$).

6 DISCUSIÓN

6.1 Imbibición en cruzamientos contrastantes

La toma de agua por parte de la semilla es un proceso vital para la hidratación de los tejidos internos (Mikac et al., 2015). El análisis de imbibición por imágenes es una forma de reducir el tiempo de implementación y se obtienen resultados similares al método gravimétrico (Figura 1). Los resultados obtenidos en este estudio demuestran una tasa de absorción diferente para los 18 genotipos evaluados, con un rango promedio entre 1,24 a 1,82 (Figura 2 y 3). Existen diferentes reportes que señalan tasas de imbibición diferencial entre genotipos de frijol, incluso siendo estos de la misma especie *P. vulgaris* (Aliu et al., 2016; Cichy et al., 2015; Devkota et al., 2022; Miano et al., 2018).

La cantidad de agua que absorbe la semilla es un rasgo de interés para los programas de mejoramiento. Por ejemplo, un reporte en semillas de girasol (*Helianthus annuus*) señala que a una tasa alta de imbibición, la germinación ocurre antes (Saux et al., 2020). Por lo tanto, el genotipo G16885 con la mayor RCA de 1,67 puede tener esta ventaja con respecto a los otros genotipos evaluados. Además, Soltani et al. (2017) encontraron una correlación positiva entre la absorción de poca agua y la tasa de sobrevivencia a inundación. Los genotipos G17913, G11007, G16130, G11317, G119121, G12858A y G11083 presentaron valores de RCA por debajo de 1,4, los cuales se pueden evaluar bajo estas condiciones.

Para evaluar el comportamiento del fenotipo de imbibición en diferentes generaciones se realizaron cruzamientos entre los genotipos. Los cuatro cruzamientos contrastantes entre alta por baja o viceversa, sí presentaron diferencias significativas (Figuras 4A, 5A, 6A y 7A). Las semillas F₁ tienen el color y tamaño del parental receptor de polen (♀) (Cuadro 8) lo que coincide con lo encontrado por Singh et al. (2017) y García-Fernández, Campa y Ferreira (2021) quienes indican que el esporofito materno controla el tamaño de la semilla y el color del tegumento está determinado por el genotipo materno.

El fenotipo de color de semilla en el cruzamiento G11787xG12858A de las semillas F_2 fue gris con manchas café (Figura 4C) y los cruzamientos G16885xG11007 y G16885xG17913 fueron negras parecido al fenotipo del P_1 (♀) (Figuras 5C y 7C). García-Fernández et al. (2021) indican que el fenotipo de color de semilla del genotipo heterocigoto (F_1) se expresa en la siguiente generación. Las semillas del cruzamiento G16130xG16885 fueron negras (Figura 6C) parecidas al fenotipo P_2 (♂) esto puede deberse a la presencia del gen *P* (pigmento) de acción dominante sobre el alelo marrón (McClellan et al., 2018, García-Fernández et al., 2021).

El cambio en el tamaño de las semillas F_2 con respecto a la F_1 (Figuras 4B, 5B, 6B y 7B) puede deberse a un factor genético del peso de la semilla, que controlaba la diferencia del tamaño de la semilla con respecto a los parentales en la generaciones F_2 (McClellan et al., 2018). El fenotipo de tamaño de semillas en frijol es un rasgo de herencia cuantitativa que tiene participación de genes en diferentes locus que hacen difícil su clasificación (Geravandi et al., 2020).

La relación entre el tamaño de semilla y la tasa de imbibición mostró una relación lineal negativa (Figura 5A-B,6A-B,7A-B), ya que, al aumentar el tamaño de la semilla, la imbibición (RCA) disminuye 0,35 (95%IC, -0,42-0,27) en los parentales (Figura10A) y 0,41 (95%IC, 0,55-0,27) en las F_2 (Figura 10B). En un estudio en frijoles rojos se encontró esta misma relación donde las semillas pequeñas se hidratan primero y absorben más agua debido una menor proporción de ácidos grasos saturados en la cubierta de la semilla, que hace más fácil el paso del agua por las capas del parénquima (Devkota et al., 2022).

La distribución del tamaño e imbibición de semillas de 16 líneas F_3 del cruzamiento G16885xG17913 presentaron valores extremos o transgresivos en comparación a las líneas parentales (Figura 8). El modelo ajustado para la F_3 (Cuadro 10) muestra que no existe correlación del área con la imbibición. Estos resultados contrastantes entre las semillas F_2 y F_3 pueden explicarse por los factores intrínsecos de la semilla

como el grosor del tegumento, número de poros de la testa, tamaño del micrópilo y tamaño de las grietas en la lente (García et al., 2021; Miano et al., 2018; Pérez Herrera & Acosta-Gallegos, 2002; Soltani et al., 2021). A nivel genético, la diferencia en la tasa de imbibición ha sido asociada a la expresión del gen *PAE-8* en semillas, que contribuye a la cementación de las células influyendo en la permeabilidad de las células de las semillas (Palmer et al., 2021; Soltani et al., 2021). Miano et al. (2018) concluyen que la imbibición es un fenómeno complejo que cualquier cambio por mejora agronómica puede afectar la cinética de la imbibición.

6.2 Genes involucrados en el proceso de imbibición

6.2.1 Expresión diferencial de genes entre genotipos de baja y alta imbibición

Los procesos metabólicos y fisiológicos que se reactivan en la imbibición están regulados por genes (Benech-Arnold et al., 2004; Devkota et al., 2022). Un total de 6812 genes se expresaron diferencialmente entre los genotipos G16885 (alta imbibición) y G17913 (baja imbibición) a la primera hora de la imbibición (Figura 14). En el genotipo G17913 la transcripción al alza de genes enzima ramificadora 1,4-alfa-glucano (*gbe*), citrato sintasa (*CSY*), aparato de importación de proteínas (*CIA*), complejo asociado a polipéptido naciente beta (β *NAC*) y proteína putativa de choque térmico (*HSP*) (Cuadro 12) están involucrados en la actividad catalítica del almidón (Tu et al., 2008), la respiración de ácidos grasos (Turk, 2021), la formación de plastidios (Kessler & Schnell, 2009), la protección de proteínas (W. Wang et al., 2014) y la prevención de la inactivación térmica de diversas proteínas (Sarkar et al., 2019), respectivamente.

Por otro lado, en el genotipo de alta imbibición (G16885) la sobreexpresión de genes nucleorreductasa 1 (*NRX1*), callosa sintasa 7 (*CalS7*), syntaxina-51 (*SYP51*), florentina 4'-O-glucosiltransferasa (*Ph-4'-OGT*), subunidad reguladora A de la serina/treonina-proteína fosfatasa 2A (*PP2A*), transportador de zinc 29 (*ZTP29*) y acuaporina TIP1 (*TIP1*) (Cuadro 12) están involucrados en el equilibrio redox celular (Marchal et al., 2014), actividad sintasa y biosíntesis del glucano (Kamat et al., 1992; Schlupmann et al., 1994), transporte de proteínas (Benedictis et al., 2013), actividad

UDP-glicosiltransferasa (Yahyaa et al., 2016), procesos celulares (Corum et al., 1996), transportador transmembrana de iones (M. Wang et al., 2010) y en el control del flujo de agua y otras moléculas (Madrid-Espinoza et al., 2018), respectivamente.

Los genes sobre expresados en el genotipo de baja imbibición (G17913) cumplen diferentes funciones reportadas. Por ejemplo, el gen *gbe* tiene dos isoenzimas reportadas PVSBE1 y PVSBE2 en frijol con diferentes roles en la actividad de la región terminal N de la amilopectina (Hamada et al., 2007). Además, el gen *CSY* tiene función catalítica en el primer paso del ciclo de Krebs, en la respiración de ácidos grasos (Pracharoenwattana et al., 2005), reportado con mayor expresión durante la germinación (Domergue et al., 2019; Pracharoenwattana et al., 2005; Turk, 2021).

Por su parte, el gen *CIA₂* de *Arabidopsis thaliana* interactúa con proteína *NF-YA* (subunidad A del factor nuclear), que influye en la señalización del ácido abscísico (Yang & Sun, 2020). Esta interacción entre *CIA* y *NF-YA* puede estar involucrado en la germinación, ya que el cambio de semilla inactiva a activa está regulado por la acción antagónica del ácido abscísico (ABA) y giberelinas (Shu et al., 2016). Por último, el gen (*HSP*) con dominio α -cristalina (ACD) tiene la función de prevenir la inactivación térmica de diversas proteínas (Sarkar et al., 2019; Zhou et al., 2018). La expresión del gen *HSP* disminuye con el proceso germinación (Zhou et al., 2018).

Por otro lado, los genes regulados al alza en el genotipo de alta imbibición (G16885) han sido reportados involucrados en el desarrollo y el crecimiento celular (Garda et al., 2018; Honsbein et al., 2009; Yahyaa et al., 2016), la germinación (R. K. Singh et al., 2019; Vander Willigen et al., 2006) y la tolerancia a estreses abióticos (Cha et al., 2022; Hasan et al., 2017; M. Wang et al., 2010). Por ejemplo, la sobre expresión del gen *NRX1* en trigo bajo estrés hídrico se asoció con la acumulación de sustancias de ajuste osmótico, como la prolina y el azúcar soluble, que mejora la capacidad de retención de agua (Y. Zhang et al., 2021). Así pues, el gen *ZTP29* se localiza en la membrana del retículo endoplasmático (RE) y se expresa

principalmente en los tejidos del hipocótilo y el cotiledón (M. Wang et al., 2010). En semillas de *Arabidopsis* la sobre expresión del gen *ZTP29* está involucrado en la autorregulación al estrés por salinidad, ya que provoca una reducción de zinc en RE y una acumulación de proteínas de respuesta (UPR) que da la tolerancia a la sal (M. Wang et al., 2011).

Además, el gen *Ca/S7* es un componente de la 1,3-betaglucano sintasa, que sintetiza calosa (Kamat et al., 1992; Shi et al., 2016). Este gen se expresa en el floema de los tejidos vasculares y es responsable de la deposición de calosa en los elementos cribosos (Xie et al., 2011). En *Arabidopsis* hubo más velocidad de translocación en las plantas con el gen *AtCa/S7* en comparación a las plantas mutantes, cuya importancia se debe a que influye en la disponibilidad de carbohidratos para los sumideros (Xie et al., 2011). Asimismo, el gen *Ph-4'-OGT* tiene actividad de UDP-glicosiltransferasa, que cataliza la adición de azúcares a una amplia gama de moléculas (Yahyaa et al., 2016). Este gen se asocia con la modulación de la ruta de los fenilpropanoides, que cambios en la concentración de estos compuestos altera el transporte de auxinas, necesarias para la elongación celular (Dare et al., 2017). En este mismo sentido, el gen *PP2A* regulan de forma antagónica la localización polar de los transportadores de auxinas (PIN1), que controlan el flujo de auxina intracelular (Xi et al., 2016). Adicionalmente, los genes *PP2A* regulan el ciclo celular (Corum et al., 1996; Garda et al., 2018).

Por último, el gen *TIP1* es una acuaporina del tonoplasto, ubicado en la membrana vacuolar (Johnson et al., 1990), involucrado en el control hidráulico general de los tejidos vegetales (Madrid-Espinoza et al., 2018). Las acuaporinas son proteínas transmembrana esenciales para controlar el flujo de agua y otras moléculas (Khan et al., 2015). En *Arabidopsis* se encontró que las acuaporinas pueden modular la velocidad de germinación de las semillas (Vander Willigen et al., 2006). Dentro de este marco, la sobreexpresión de este gen en el genotipo de alta imbibición (G16885) puede explicar una mayor tasa de absorción de agua (Figura 7A) y en consecuencia una mayor área bajo la curva de la germinación (AUC) (Figuras 23 y

25) y un menor tiempo para alcanzar el 50 por ciento de la germinación (t_{50}) (Figura 26) en comparación a los genotipos de baja imbibición (G17913 y G11007).

6.3 Diferencias morfológicas a nivel celular en las semillas

Las células del parénquima medular del cotiledón de los genotipos G17913, G11007, G16130, G16885, G11787 y G12858A muestran abundancia de gránulos de almidón ovalados y con espacios intercelulares (Figura 20). Los gránulos de almidón deben degradarse para la removilización de reservas durante la germinación (García et al. 2021). Además, las células del cotiledón tienen una pared celular gruesa, con forma irregular, con presencia de haces del sistema vascular (Figura 20). Las características morfológicas de las células del cotiledón son similares a lo observado en semillas de frijol y guisantes (*Pisum sativum* L.) por microscopia de transmisión y microscopia de barrido, respectivamente (Ajala et al., 2022; Miano et al., 2018; Siqueira et al., 2018).

Las células del cotiledón de mayor tamaño se registraron en los genotipos G16130 y G17913, que a su vez tienen las semillas con mayor tamaño (Figura 6B y 6C y Figura 7B y 7C) y menor tasa de imbibición (Figura 2 y 3). Esto puede atribuirse a una mayor cantidad de almidón, una pared celular más gruesa y mayor contenido de material fibroso que provocan una absorción de agua más lenta (Ajala et al. 2022). Las áreas de las células del parénquima de la periferia del eje embrionario son variables para los seis genotipos evaluados (Cuadro 14). Estos resultados se pueden atribuir, a que las mediciones se realizaron en células en división, ya que las observaciones fueron realizadas a las 20 horas de iniciada la imbibición.

Las estructuras del micrópilo y lente de los genotipos G16885 (alta imbibición) y G17913 (baja imbibición) (Figura 21) mostraron diferencias en el área de las microgrietas en la lente que explicaría por que la accesión G16885 toma 0,46 más de agua con respecto a G17913 (Figura 7A). Las microgrietas en la lente, en un estudio realizado en frijol por Soltani et al. (2021) fue asociado a la inserción de 5 pb en séptimo exón del cromosoma 3, del gen *pectina acetil esterasa 8*. Es mutación

provoca un aumento en la acetilación de la pectina que conduce a una disminución de iones calcio, induciendo un aflojamiento en la pared celular, por lo que se forman microgrietas en el área de la lente (Palmer et al., 2021; Soltani et al., 2021). El fenotipo del micrópilo en forma de Y aparentemente abierto (Figura 21A) también fue observado en cultivares de frijol (Miano et al., 2018). La diferencia en el tamaño del micrópilo (Figura 21A y 21B) puede provocar tasas de imbibición contrastantes entre G16885 y G17913 (Figura 7A), debido a que el agua ingresa por esta estructura durante la hidratación (Mikac et al., 2015).

6.4 Relación de la poca imbibición de agua con la capacidad de germinativa

El tratamiento con polietilenglicol reduce el potencial hídrico, el cual provoca una disminución en la tasa de imbibición y la germinación del frijol (Keshtiban, 2015; Martínez-Nieto et al., 2020; Saux et al., 2020; Zayed, 2010). Una concentración de -0,4 MPa de PEG disminuyó la cantidad de agua absorbida por las semillas de los genotipos G16885, G11007 y NAMBI a las 20 horas de inicio de la imbibición (Figura 22). En el genotipo G17913 no hubo diferencia significativa entre el tratamiento con PEG y testigo (agua), lo que coincide con lo encontrado por Saux et al. (2020) en semilla de girasol (*H. annuus*).

Los genotipos G17913 y G11007 de baja imbibición (mayor área de semillas) mostraron un retraso de 1 a 2 días con respecto al genotipo G16885 de alta imbibición (menor área de semilla), tanto en condiciones de estrés hídrico como en el testigo (agua) (Figura 23). Estos resultados, concuerdan con estudios en frijol, que mencionan que semillas de menor tamaño tienen una tendencia a alcanzar la tasa germinación antes que la semillas de mayor tamaño debido a que se tiene una menor superficie específica para hidratar (Miano et al., 2018; J. Singh et al., 2017).

El tratamiento de -0,4 MPa con PEG reduce a un 73 por ciento la germinación máxima (Figura 24) en todas las muestras evaluadas, sin diferencias significativas entre los genotipos. Esto coincide con estudios en frijol común y frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.), que reportan un 68 y 60 por ciento en semillas con un

potencial hídrico de -0,4 MPa (PEG 6000) (Keshtiban, 2015; Martínez-Nieto et al., 2020). Esto se debe a una reducción en la cantidad de agua que tiene efecto en la turgencia celular, que provoca una disminución de enzimas y hormonas que afectan los procesos metabólicos y fisiológicos (Nascimento et al., 2019; Saux et al., 2020).

Por otro lado, el tratamiento con -0,4 MPa (PEG 6000) con respecto al testigo (agua) presento una menor área bajo la curva de la germinación (AUC) (Figura 25) y mayor tiempo para alcanzar el 50 por ciento de la germinación (t_{50}) (Figura 26). Esto debido a la disminución del potencial osmótico que provoca una movilización y degradación de reserva más lenta (Reis et al., 2012). El genotipo G16885 es un genotipo que absorbe mayor cantidad de agua con respecto a G17913 y G11007 bajo condiciones de estrés hídrico que puede provocar una mayor expresión de transcritos de choque térmico como lo reportado en semilla de girasol (Saux et al., 2020). En semillas de girasol esta diferencia se atribuye a la expresión de genes relacionados aminoácidos que sirven como osmolitos y proteínas asociadas a tolerancia al estrés hídrico (Saux et al., 2020)..

El genotipo de alta imbibición (G16885) presentó una mayor AUC y menor t_{50} , tanto en condición de estrés hídrico (-0,4 MPa PEG6000) como en el testigo (agua), en comparación con los genotipos de baja imbibición (Figuras 25 y 26). Una mayor AUC y menor t_{50} es asociado al vigor y uniformidad, lo que indica mayor velocidad de germinación (Zerpa-Catanho et al., 2019). En *Arabidopsis* se trataron semillas con mercurio, un bloqueador general de las acuaporinas, que redujo la velocidad de germinación e indujo un retraso en la ruptura de la cubierta de la semilla y la emergencia de la radícula (Vander Willigen et al., 2006).

Además, los genes *TIP1* (acuaporinas del tonoplasto) han sido reportados con mayor expresión en trigo (Madrid-Espinoza et al., 2018), sorgo (Hasan et al., 2017) y *Arabidopsis* (Khan et al., 2015) bajo condiciones de sequía, que les otorgo una mejora en la germinación, viabilidad de semillas y crecimiento de las plantas. Curiosamente, hubo una mayor expresión del gen *TIP1* (acuaporina del tonoplasto)

en el genotipo G16885 a la primera hora de iniciada la imbibición que podría explicar porque tiene una mayor velocidad de germinación, pero se requieren de estudios posteriores para validar esta afirmación.

Los resultados obtenidos indican que la imbibición está regulada por varios genes y no se adapta a los patrones de herencia mendeliana. El fenotipo de imbibición evaluado en los parentales y generación F₂ indica que hay una relación entre el tamaño de la semilla y la tasa de imbibición, pero en la generación F₃ este patrón no se observó. Sería interesante evaluar esta relación imbibición/tamaño de semilla hasta una generación F₆ cuando ya se tiene un 96,875 por ciento de homocigosis.

Como se mencionó, el tamaño de la semilla influye de cierta manera en la tasa de imbibición, pero depende de factores intrínsecos de la semilla, como las grietas en la lente, tamaño de las células y forma del micrópilo (Figura 27). La expresión al alza de genes en la primera hora de iniciada la imbibición en el genotipo de baja imbibición G17913 relacionados con la actividad catalítica del almidón (*gbe*) y la respiración de ácidos grasos (*CSY*) sugiere que tiene un mayor contenido de reservas a degradar, coherente a que este genotipo tiene un mayor tamaño de semilla (1,72 cm²), que se podría confirmar con un estudio de perfil químico. Por último, el genotipo de alta imbibición (G16885) tiene una mayor velocidad de germinación tanto en condiciones normales y bajo estrés hídrico (Figura 27). Esto contrario a lo que se planteó inicialmente en esta investigación que: “los genotipos que imbiben menor cantidad de agua tienen alguna ventaja a germinar en condiciones de baja disponibilidad de agua”.

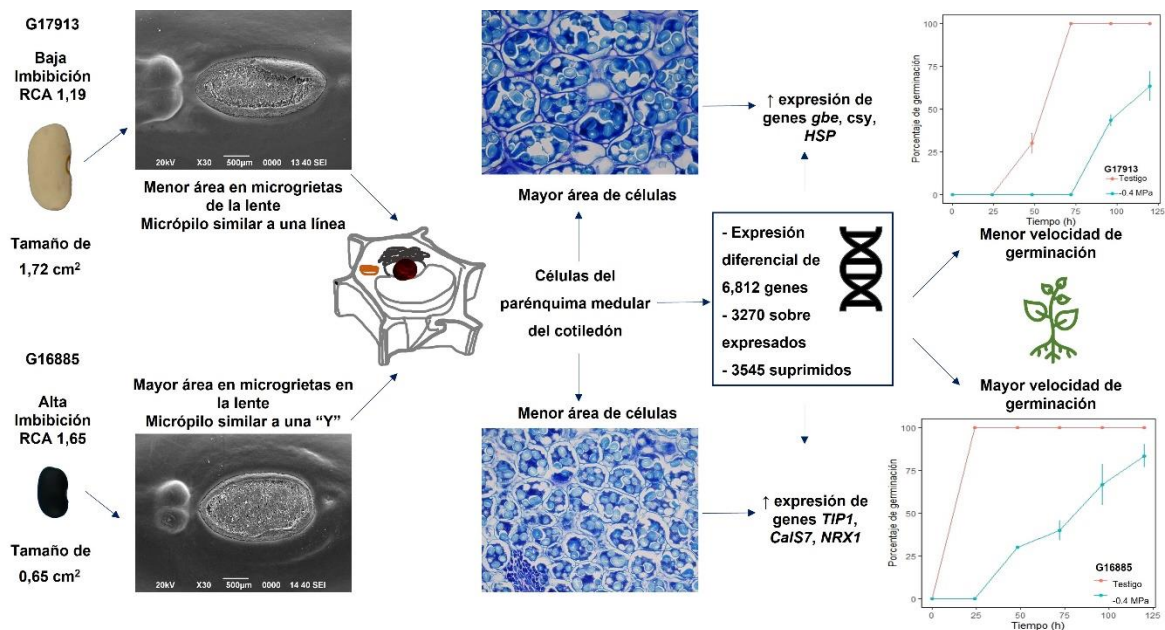


Figura 27. Factores que afectan a la imbibición y germinación de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). RCA: razón de crecimiento de la semilla, *gbe*: enzima ramificadora 1,4-alfa-glucano, *csy*: citrato sintasa, *HSP*: proteína de choque térmico, *TIP1*: acuaporina del tonoplasto, *CalS7*: callosa sintasa, *NRX1*: nucleorredoxina 1, ↑: sobre expresión de genes.

7 CONCLUSIONES

- a. La imbibición está regulada por varios genes y no se adapta a los patrones de herencia mendeliana.
- b. La expresión diferencial entre el genotipo de alta y baja imbibición fue de 6812 genes, que están anotados con funciones moleculares, procesos biológicos, actividad catalítica y como parte de componentes celulares.
- c. El genotipo de alta imbibición (G16885) tiene semillas de menor tamaño, de menor área en las células del parénquima, mayor área de grietas en la lente, un micropilo en forma de “Y” en comparación con el genotipo de baja imbibición (G17913) con un mayor tamaño de semilla, mayor área en las células del parénquima, menor área de grietas y un micropilo similar a una línea.
- d. El genotipo de alta imbibición (G16885) bajo condiciones de estrés hídrico tuvo una mayor velocidad de germinación, es decir mayor vigor y uniformidad.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ajala, A., Kaur, L., Lee, S. J., & Singh, J. (2022). Influence of seed microstructure on the hydration kinetics and oral-gastro-small intestinal starch digestion in vitro of New Zealand pea varieties. *Food Hydrocolloids*, 129, 107631. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107631>
- Aliu, S., Rusinovci, I., Fetahu, S., Bradhi, N., & Bislimi, K. (2016). Effect of water stress on seed imbibitions in common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Acta Horticulturae*, 1142, 429-434. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1142.64>
- Andrews, S. (2010). *FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data* (v0.11.9.). <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Arias, A. G., Vargas-Corrales, K., Benavides-Acevedo, M., Bolívar-González, A., Sánchez-Chacón, E., García-Díaz, E., Rodríguez, F. D.-, Huang, N. T. W., Hegele, M., Wünsche, J.-N., & Valdez-Melara, M. (2019). Morphological and biochemical changes during somatic embryogenesis in mahogany, *Swietenia macrophylla* (Meliaceae). *Revista de Biología Tropical*, 67(3), Art. 3. <https://doi.org/10.15517/rbt.v67i3.34172>
- Assefa, T., Wu, J., Beebe, S. E., Rao, I. M., Marcomin, D., & Claude, R. J. (2015). Improving adaptation to drought stress in small red common bean: Phenotypic differences and predicted genotypic effects on grain yield, yield components and harvest index. *Euphytica*, 203(3), 477-489. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1242-x>
- Aubry, C., Morère-Le Paven, M.-C., Chateigner-Boutin, A.-L., Teulat-Merah, B., Ricoult, C., Peltier, D., Jalouzot, R., & Limami, A. M. (2003). A gene encoding

- a germin-like protein, identified by a cDNA-AFLP approach, is specifically expressed during germination of *Phaseolus vulgaris*. *Planta*, 217(3), 466-475.
- Benech-Arnold, R., Sánchez, R., Benech-Arnold, R., Sanchez, R., & Sánchez, R. (2004). *Handbook of seed physiology: Applications to agriculture*. Taylor & Francis Group. <http://ebookcentral.proquest.com/lib/sibdilibro-ebooks/detail.action?docID=244212>
- Benedictis, M. D., Bleve, G., Faraco, M., Stigliano, E., Grieco, F., Piro, G., Dalessandro, G., & Sansebastiano, G. P. D. (2013). *AtSYP51/52* functions diverge in the post-golgi traffic and differently affect vacuolar sorting. *Molecular Plant*, 6(3), 916-930. <https://doi.org/10.1093/mp/sss117>
- Bewley, J. D., & Black, M. (2013). *Seeds: Physiology of development and germination*. Springer Science & Business Media.
- Blair, G., Cooper, J., Coppock, A., Humphreys, M., & Sonnet, L. (2022). *estimatr: Fast Estimators for Design-Based Inference*. <https://declaredesign.org/r/estimatr/>, <https://github.com/DeclareDesign/estimatr>.
- Bove, J., Jullien, M., & Grappin, P. (2001). Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biology*, 3(1), reviews1002.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-3-1-reviews1002>
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology*, 34(5), 525-527. <https://doi.org/10.1038/nbt.3519>
- Cha, J.-Y., Ahn, G., Jeong, S. Y., Shin, G.-I., Ali, I., Ji, M. G., Alimzhan, A., Lee, S. Y., Kim, M. G., & Kim, W.-Y. (2022). Nucleoredoxin 1 positively regulates heat

- stress tolerance by enhancing the transcription of antioxidants and heat-shock proteins in tomato. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 635, 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.10.033>
- Chaves-Barrantes, N. F., Polanía, J. A., Muñoz-Perea, C. G., Rao, I. M., & Beebe, S. E. (2018). Caracterización fenotípica por resistencia a sequía terminal de germoplasma de frijol común. *Agronomía Mesoamericana*, 1-17. <https://doi.org/10.15517/ma.v29i1.27618>
- Cichy, K. A., Wiesinger, J. A., & Mendoza, F. A. (2015). Genetic diversity and genome-wide association analysis of cooking time in dry bean (*Phaseolus vulgaris*L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 128(8), 1555-1567. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2531-z>
- Corum, J. W., Hartung, A. J., Stamey, R. T., & Rundle, S. J. (1996). Characterization of DNA sequences encoding a novel isoform of the 55 kDa B regulatory subunit of the type 2A protein serine/threonine phosphatase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 31(2), 419-427. <https://doi.org/10.1007/BF00021804>
- Dare, A. P., Yauk, Y.-K., Tomes, S., McGhie, T. K., Rebstock, R. S., Cooney, J. M., & Atkinson, R. G. (2017). Silencing a phloretin-specific glycosyltransferase perturbs both general phenylpropanoid biosynthesis and plant development. *The Plant Journal*, 91(2), 237-250. <https://doi.org/10.1111/tpj.13559>
- Devkota, L., He, L., Midgley, J., & Haritos, V. S. (2022). Effect of seed coat microstructure and lipid composition on the hydration behavior and kinetics of two red bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of Food Science*, 87(2), 528-542. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16030>

- Diaz-Baena, M., Delgado-García, E., Pineda, M., Galvez-Valdivieso, G., & Piedras, P. (2021). S-Like ribonuclease T2 genes are induced during mobilisation of nutrients in cotyledons from common bean. *Agronomy*, 11(3), Art. 3. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030490>
- Domergue, J.-B., Abadie, C., Limami, A., Way, D., & Tcherkez, G. (2019). Seed quality and carbon primary metabolism. *Plant, Cell & Environment*, 42(10), 2776-2788. <https://doi.org/10.1111/pce.13618>
- Doyle, J. J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Elias, S. G., Copeland, L. O., McDonald, M. B., & Baalbaki, R. Z. (2012). *Seed Testing: Principles and Practices*. Michigan State University Press. <http://ebookcentral.proquest.com/lib/sibdilibro-ebooks/detail.action?docID=3338273>
- Ellies, R. H., Hong, T. D., & Roberts, E. H. (1985). *Handbook of seed technology for Genebanks: Vol. I*.
- FAOSTAT. (2022). <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Finch-Savage, W. E., & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171(3), 501-523. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x>
- Gaitán-Solís, E., Duque, M. C., Edwards, K. J., & Tohme, J. (2002). Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. *Crop Science*, 42(6), 2128-2136. <https://doi.org/10.2135/cropsci2002.2128>
- Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P. C., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., & Job, D. (2001). Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and

priming. *Plant Physiology*, 126(2), 835-848.

<https://doi.org/10.1104/pp.126.2.835>

Ganopoulos, I., Bosmali, I., Madesis, P., & Tsaftaris, A. (2012). Microsatellite genotyping with HRM (High Resolution Melting) analysis for identification of the PGI common bean variety Plake Megalosperma prespon. *European Food Research and Technology*, 234(3), 501-508. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1653-z>

García, M. C., Peña-Valdivia, C. B., Gracida, L. A. B., Jiménez, P. Y., Esteva, A. G., & Padilla-Chacón, D. (2021). Effects of water restriction on carbohydrates concentration, starch granules size and amylolytic activity in seeds of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius* A. Gray. *Botanical Sciences*, 99(2), Art. 2. <https://doi.org/10.17129/botsci.2647>

García-Fernández, C., Campa, A., & Ferreira, J. J. (2021). Dissecting the genetic control of seed coat color in a RIL population of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 134(11), 3687-3698. <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03922-y>

Garda, T., Kónya, Z., Freytag, C., Erdődi, F., Gonda, S., Vasas, G., Szücs, B., M-Hamvas, M., Kiss-Szikszai, A., Vámosi, G., & Máthé, C. (2018). Allyl-Isothiocyanate and Microcystin-LR reveal the protein phosphatase mediated regulation of metaphase-anaphase transition in *Vicia faba*. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01823>

Geravandi, M., Cheghamirza, K., Farshadfar, E., & Gepts, P. (2020). QTL analysis of seed size and yield-related traits in an inter-gene pool population of

common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Scientia Horticulturae*, 274, 109678.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109678>

Gómez Bolaños, I. (2018). *Elaboración de un sistema para la toma y análisis automático de imágenes para evaluar el proceso de germinación en semillas de frijol (Phaseolus vulgaris)* [Universidad de Costa Rica]. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/handle/123456789/8989>

Graeber, K., Nakabayashi, K., Miatton, E., Leubner-Metzger, G., & Soppe, W. J. J. (2012). Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant, Cell and Environment*, 35(10), 1769-1786. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02542.x>

Hamada, S., Ito, H., Ueno, H., Takeda, Y., & Matsui, H. (2007). The N-terminal region of the starch-branching enzyme from *Phaseolus vulgaris* L. is essential for optimal catalysis and structural stability. *Phytochemistry*, 68(10), 1367-1375. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.02.024>

Hasan, S. A., Rabei, S. H., Nada, R. M., & Abogadallah, G. M. (2017). Water use efficiency in the drought-stressed sorghum and maize in relation to expression of aquaporin genes. *Biologia Plantarum*, 61(1), 127-137. <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0656-9>

Honsbein, A., Sokolovski, S., Grefen, C., Campanoni, P., Pratelli, R., Paneque, M., Chen, Z., Johansson, I., & Blatt, M. R. (2009). A tripartite SNARE-K⁺ channel complex mediates in channel-dependent K⁺ nutrition in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21(9), 2859-2877. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.066118>

Hrdlickova, R., Toloue, M., & Tian, B. (2017). RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *WIREs RNA*, 8(1), e1364. <https://doi.org/10.1002/wrna.1364>

- Jiang, S., An, H., Xu, F., & Zhang, X. (2020). Chromosome-level genome assembly and annotation of the loquat (*Eriobotrya japonica*) genome. *GigaScience*, 9(giaa015). <https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa015>
- Jiang, Z., Zhou, X., Li, R., Michal, J. J., Zhang, S., Dodson, M. V., Zhang, Z., & Harland, R. M. (2015). Whole transcriptome analysis with sequencing: Methods, challenges and potential solutions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(18), 3425-3439. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1934-y>
- Johnson, K. D., Höfte, H., & Chrispeels, M. J. (1990). An intrinsic tonoplast protein of protein storage vacuoles in seeds is structurally related to a bacterial solute transporter (GlpF). *The Plant Cell*, 2(6), 525-532. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.6.525>
- Joosen, R. V. L., Kodde, J., Willems, L. A. J., Ligterink, W., Plas, L. H. W. van der, & Hilhorst, H. W. M. (2010). Germinator: A software package for high-throughput scoring and curve fitting of *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Journal*, 62(1), 148-159. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04116.x>
- Kader, M. A., & Jutzi, S. C. (2002). Temperature, osmotic pressure and seed treatments influence imbibition rates in *Sorghum* seeds. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 188(4), 286-290. <https://doi.org/10.1046/j.1439-037X.2002.00581.x>
- Kamat, U., Garg, R., & Sharma, C. B. (1992). Purification to homogeneity and characterization of a 1,3- β -glucan (callose) synthase from germinating *Arachis hypogaea* cotyledons. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 298(2), 731-739. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90473-A](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90473-A)

- Kawakatsu, T., Nery, J. R., Castanon, R., & Ecker, J. R. (2017). Dynamic DNA methylation reconfiguration during seed development and germination. *Genome Biology*, 18(1), 171. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1251-x>
- Keshtiban, R. K. (2015). Effects of salinity stress and drought due to different concentrations of sodium chloride and polyethylene glycol 6000 on germination and seedling growth characteristics of lentil (*Lens culinaris* Medik). *Advances in Environmental Biology*, 9(5), 229-235.
- Kessler, F., & Schnell, D. (2009). Chloroplast biogenesis: Diversity and regulation of the protein import apparatus. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(4), 494-500. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.03.004>
- Khan, K., Agarwal, P., Shanware, A., & Sane, V. A. (2015). Heterologous expression of two *Jatropha* aquaporins imparts drought and salt tolerance and improves seed viability in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE*, 10(6), e0128866. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128866>
- Kikuchi, K., Koizumi, M., Ishida, N., & Kano, H. (2006). Water uptake by dry beans observed by micro-magnetic resonance imaging. *Annals of Botany*, 98(3), 545-553. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl145>
- Kim, D., Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2015). HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 12(4), 357-360. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3317>
- Lee, S., Cheng, H., King, K. E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N. P., & Peng, J. (2002). Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following

- imbibition. *Genes & Development*, 16(5), 646-658.
<https://doi.org/10.1101/gad.969002>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923-930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>
- Louf, J.-F., Zheng, Y., Kumar, A., Bohr, T., Gundlach, C., Harholt, J., Poulsen, H. F., & Jensen, K. H. (2018). Imbibition in plant seeds. *Physical Review E*, 98(4), 042403. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.98.042403>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Mader, E., Ruzicka, J., Schmiederer, C., & Novak, J. (2011). Quantitative high-resolution melting analysis for detecting adulterations. *Analytical Biochemistry*, 409(1), 153-155. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.10.009>
- Madrid-Espinoza, J., Brunel-Saldias, N., Guerra, F. P., Gutiérrez, A., & Del Pozo, A. (2018). Genome-Wide identification and transcriptional regulation of aquaporin genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) under water stress. *Genes*, 9(10), Art. 10. <https://doi.org/10.3390/genes9100497>
- Marchal, C., Delorme-Hinoux, V., Bariat, L., Siala, W., Belin, C., Saez-Vasquez, J., Riondet, C., & Reichheld, J.-P. (2014). NTR/NRX define a new thioredoxin

- system in the nucleus of *Arabidopsis thaliana* cells. *Molecular Plant*, 7(1), 30-44. <https://doi.org/10.1093/mp/sst162>
- Martínez-Nieto, M. I., Estrelles, E., Prieto-Mossi, J., Roselló, J., & Soriano, P. (2020). Resilience capacity assessment of the traditional lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) landraces facing climate change. *Agronomy*, 10(6), Art. 6. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060758>
- Mayor Duran, V. M., Raatz, B., & Blair, M. W. (2016). Desarrollo de líneas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) tolerante a sequía a partir de cruces inter acervo con genotipos procedentes de diferentes orígenes (Mesoamericano y Andino). *Acta Agronómica*, 65(4), 431-438. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n4.48680>
- McClellan, P. E., Bett, K. E., Stonehouse, R., Lee, R., Pflieger, S., Moghaddam, S. M., Geffroy, V., Miklas, P., & Mamidi, S. (2018). White seed color in common bean (*Phaseolus vulgaris*) results from convergent evolution in the P (pigment) gene. *New Phytologist*, 219(3), 1112-1123. <https://doi.org/10.1111/nph.15259>
- McDonald, M. B., Vertucci, C. W., & Roos, E. E. (1988). Soybean seed Imbibition: Water absorption by seed parts. *Crop Science*, 28(6), [cropsci1988.0011183X002800060026x](https://doi.org/10.2135/cropsci1988.0011183X002800060026x). <https://doi.org/10.2135/cropsci1988.0011183X002800060026x>
- Miano, A. C., Saldaña, E., Campestrini, L. H., Chiorato, A. F., & Augusto, P. E. D. (2018). Correlating the properties of different carioca bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*) with their hydration kinetics. *Food Research International*, 107, 182-194. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.030>

- Michel, B. E., & Kaufmann, M. R. (1973). The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology*, *51*(5), 914-916. <https://doi.org/10.1104/pp.51.5.914>
- Mikac, U., Sepe, A., & Serša, I. (2015). MR microscopy for noninvasive detection of water distribution during soaking and cooking in the common bean. *Magnetic Resonance Imaging*, *33*(3), 336-345. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2014.12.001>
- Miller, N. D., Stelpflug, S. C., Kaeppler, S. M., & Spalding, E. P. (2018). A machine vision platform for measuring imbibition of maize kernels: Quantification of genetic effects and correlations with germination. *14*(1), 115.
- Mutz, K.-O., Heilkenbrinker, A., Lönne, M., Walter, J.-G., & Stahl, F. (2013). Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Current Opinion in Biotechnology*, *24*(1), 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.09.004>
- Mwami, B., Nguluu, S., Kimiti, J., & Kimatu, J. (2017). Effects of water imbibition of selected bean varieties on germination. *5*, 579-587.
- Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Özkan, H., Chung, G., & Baloch, F. S. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: Current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *32*(2), 261-285. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>
- Nascimento, M. das G. R., Silva, M. L. M. da, Alves, E. U., & Rodrigues, C. M. (2019). Physiological potential of *Phaseolus lunatus* L. seeds subjected to water stress at different temperatures. *Semina: Ciências Agrárias*, *40*(6Supl2), Art. 6Supl2. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n6Supl2p2877>

- Nicolas, G., Bradford, K. J., & Come, D. (2003). *Biology of Seeds: Recent research advances*. CABI. <http://ebookcentral.proquest.com/lib/sibdilibro-ebooks/detail.action?docID=295074>
- O'Rourke, J. A., Bolon, Y.-T., Bucciarelli, B., & Vance, C. P. (2014). Legume genomics: Understanding biology through DNA and RNA sequencing. *Annals of Botany*, 113(7), 1107-1120. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu072>
- Palmer, J. P., Pajak, A., Robson, B., Zhang, B., Joshi, J., Diapari, M., Pauls, K. P., & Marsolais, F. (2021). Pectin acetyltransferase 8 influences pectin acetylation in the seed coat, seed imbibition, and dormancy in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Legume Science*, 4(3), e130. <https://doi.org/10.1002/leg3.130>
- Pérez Herrera, P., & Acosta-Gallegos, J. A. (2002). Permeabilidad de la testa y la porción micropilo-hilio en semilla de frijol silvestre y cultivado. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 25(1), 57-63.
- Polania, J., Rao, I. M., Cajiao, C., Grajales, M., Rivera, M., Velasquez, F., Raatz, B., & Beebe, S. E. (2017). Shoot and root traits contribute to drought resistance in recombinant inbred lines of MD 23–24 × SEA 5 of common bean. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00296>
- Pollock, B. M., & Toole, V. K. (1966). Imbibition period as the critical temperature sensitive stage in germination of lima bean seeds. *Plant Physiology*, 41(2), 221-229. <https://doi.org/10.1104/pp.41.2.221>
- Pracharoenwattana, I., Cornah, J. E., & Smith, S. M. (2005). Arabidopsis peroxisomal citrate synthase is required for fatty acid respiration and seed germination. *The Plant Cell*, 17(7), 2037-2048. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.031856>

- R Core Team. (2022). *R: A language and environment for statistical computing*. (versión 4.2.0). R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Reis, R. C. R., Dantas, B. F., & Pelacani, C. R. (2012). Mobilization of reserves and germination of seeds of *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae—Papilionoideae) under different osmotic potentials. *Revista Brasileira de Sementes*, 34(4), 580-588. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222012000400008>
- Sarkar, N. K., Kotak, S., Agarwal, M., Kim, Y.-K., & Grover, A. (2019). Silencing of class I small heat shock proteins affects seed-related attributes and thermotolerance in rice seedlings. *Planta*, 251(1), 26. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03318-9>
- Saux, M., Ponnaiah, M., Langlade, N., Zanchetta, C., Balliau, T., El-Maarouf-Bouteau, H., & Bailly, C. (2020). A multiscale approach reveals regulatory players of water stress responses in seeds during germination. *Plant, Cell & Environment*, 43(5), 1300-1313. <https://doi.org/10.1111/pce.13731>
- Schlupmann, H., Bacic, A., & Read, S. M. (1994). Uridine diphosphate glucose metabolism and callose synthesis in cultured pollen tubes of *Nicotiana glauca* Link et Otto. *Plant Physiology*, 105(2), 659-670. <https://doi.org/10.1104/pp.105.2.659>
- Schmutz, J., McClean, P. E., Mamidi, S., Wu, G. A., Cannon, S. B., Grimwood, J., Jenkins, J., Shu, S., Song, Q., Chavarro, C., Torres-Torres, M., Geffroy, V., Moghaddam, S. M., Gao, D., Abernathy, B., Barry, K., Blair, M., Brick, M. A., Chovatia, M., ... Jackson, S. A. (2014a). A reference genome for common

- bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics*, 46(7), Art. 7. <https://doi.org/10.1038/ng.3008>
- Schmutz, J., McClean, P. E., Mamidi, S., Wu, G. A., Cannon, S. B., Grimwood, J., Jenkins, J., Shu, S., Song, Q., Chavarro, C., Torres-Torres, M., Geffroy, V., Moghaddam, S. M., Gao, D., Abernathy, B., Barry, K., Blair, M., Brick, M. A., Chovatia, M., ... Jackson, S. A. (2014b). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics*, 46(7), Art. 7. <https://doi.org/10.1038/ng.3008>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Shi, X., Han, X., & Lu, T. (2016). Callose synthesis during reproductive development in monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Signaling & Behavior*, 11(2), e1062196. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1062196>
- Shimizu G, D., Marubayashi R., Y. P., & Gonçalves L., S. A. (2022). *AgroR: Experimental statistics and graphics for agricultural sciences* (1.2.6). <https://cran.r-project.org/web/packages/AgroReg/index.html>
- Shu, K., Liu, X., Xie, Q., & He, Z. (2016). Two faces of one seed: Hormonal regulation of dormancy and germination. *Molecular Plant*, 9(1), 34-45. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.08.010>
- Singh, J., Clavijo Michelangeli, J. A., Gezan, S. A., Lee, H., & Vallejos, C. E. (2017). Maternal effects on seed and seedling phenotypes in reciprocal F1 hybrids of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.00042>

- Singh, R. K., Miskolczi, P., Maurya, J. P., & Bhalerao, R. P. (2019). A tree ortholog of SHORT VEGETATIVE PHASE floral repressor mediates photoperiodic control of bud dormancy. *Current Biology*, 29(1), 128-133.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.11.006>
- Siqueira, B. S., Fernandes, K. F., Brito, P. V. A., & Santos, F. C. A. (2018). Histochemical and ultrastructural characterization of easy-to-cook and hard-to-cook carioca bean genotypes. *LWT*, 97, 117-123. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.048>
- Soltani, A., MafiMoghaddam, S., Walter, K., Restrepo-Montoya, D., Mamidi, S., Schroder, S., Lee, R., McClean, P. E., & Osorno, J. M. (2017). Genetic architecture of flooding tolerance in the dry bean Middle-American diversity panel. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.01183>
- Soltani, A., Walter, K. A., Wiersma, A. T., Santiago, J. P., Quiqley, M., Chitwood, D., Porch, T. G., Miklas, P., McClean, P. E., Osorno, J. M., & Lowry, D. B. (2021). The genetics and physiology of seed dormancy, a crucial trait in common bean domestication. *BMC Plant Biology*, 21(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02837-6>
- Stelpflug, S. C. (2015). *Phenotypic analysis and genetic dissection of seed imbibition and early germination in maize (Zea mays L.)* [Tesis Doctorado, University of Wisconsin-Madison]. <https://search-proquest-com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/docview/1882654350?pq-origsite=primo>
- Torres, A., Cova, A., & Valera, D. (2018). Efecto del proceso de germinación de granos de *Cajanuscajan* en la composición nutricional, ácidos grasos,

- antioxidantes y bioaccesibilidad mineral. *Revista chilena de nutrición*, 45(4), 323-330. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182018000500323>
- Tu, Q., Dong, H., Yao, H., Fang, Y., Dai, C., Luo, H., Yao, J., Zhao, D., & Li, D. (2008). Global identification of significantly expressed genes in developing endosperm of rice by expression sequence tags and cDNA array approaches. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(9), 1078-1088. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00714.x>
- Turk, H. (2021). Progesterone promotes mitochondrial respiration at the biochemical and molecular level in germinating maize seeds. *Plants*, 10(7), Art. 7. <https://doi.org/10.3390/plants10071326>
- Valerio Cubillo, O., Vargas Elías, G., & Barboza Barquero, L. (2020). Modelado de la cinética de hidratación del frijol Matambú (*Phaseolus vulgaris*) utilizando un sistema automático basado en análisis de imágenes digitales. *Revista Ingeniería*, 30(2), 63-76. <https://doi.org/10.15517/ri.v30i2.39588>
- Vander Willigen, C., Postaire, O., Tournaire-Roux, C., Boursiac, Y., & Maurel, C. (2006). Expression and inhibition of aquaporins in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant and Cell Physiology*, 47(9), 1241-1250. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcj094>
- Villanueva, M. A., Campos, F., Díaz, C., Colmenero-Flores, J. M., Dantán, E., Sánchez, F., & Covarrubias, A. A. (1999). Actin expression in germinating seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, 207(4), 582-589. JSTOR.
- Wang, M., Xu, Q., Yu, J., & Yuan, M. (2010). The putative *Arabidopsis* zinc transporter ZTP29 is involved in the response to salt stress. *Plant Molecular Biology*, 73(4), 467-479. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9633-4>

- Wang, M., Xu, Q., & Yuan, M. (2011). Zinc homeostasis is involved in unfolded protein response under salt stress. *Plant Signaling & Behavior*, 6(1), 77-79. <https://doi.org/10.4161/psb.6.1.14019>
- Wang, W., Xu, M., Wang, Y., & Jamil, M. (2014). Basal transcription factor 3 plays an important role in seed germination and seedling growth of rice. *BioMed Research International*, 2014, e465739. <https://doi.org/10.1155/2014/465739>
- Wei, T., He, Z., Tan, X., Liu, X., Yuan, X., Luo, Y., & Hu, S. (2015). An integrated RNA-Seq and network study reveals a complex regulation process of rice embryo during seed germination. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 464(1), 176-181. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.06.110>
- Xi, W., Gong, X., Yang, Q., Yu, H., & Liou, Y.-C. (2016). Pin1At regulates *PIN1* polar localization and root gravitropism. *Nature Communications*, 7(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms10430>
- Xie, B., Wang, X., Zhu, M., Zhang, Z., & Hong, Z. (2011). *CalS7* encodes a callose synthase responsible for callose deposition in the phloem. *The Plant Journal*, 65(1), 1-14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04399.x>
- Xu, E., Chen, M., He, H., Zhan, C., Cheng, Y., Zhang, H., & Wang, Z. (2017). Proteomic analysis reveals proteins involved in seed imbibition under salt stress in rice. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02006>
- Yahyaa, M., Davidovich-Rikanati, R., Eyal, Y., Sheachter, A., Marzouk, S., Lewinsohn, E., & Ibdah, M. (2016). Identification and characterization of UDP-glucose:Phloretin 4'-O-glycosyltransferase from *Malus x domestica* Borkh.

Phytochemistry, 130, 47-55.

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.06.004>

Yang, C.-Y., & Sun, C.-W. (2020). Sequence analysis and protein interactions of *Arabidopsis* CIA2 and CIL proteins. *Botanical Studies*, 61(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s40529-020-00297-z>

Yongqi, H., Jia, Z., Defeng, F., Zhibo, H., Jiaming, L., Yufei, Z., Jinping, C., Jifeng, Y., & Zhoufei, W. (2020a). RNA-Seq study reveals AP2-domain-containing signalling regulators involved in initial imbibition of seed germination in rice. *Rice Science*, 27(4), 302-314. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2020.05.006>

Yongqi, H., Jia, Z., Defeng, F., Zhibo, H., Jiaming, L., Yufei, Z., Jinping, C., Jifeng, Y., & Zhoufei, W. (2020b). RNA-Seq study reveals AP2-domain-containing Signalling regulators involved in initial imbibition of seed germination in rice. *Rice Science*, 27(4), 302-314. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2020.05.006>

Zargar, S. M., Mahajan, R., Nazir, M., Nagar, P., Kim, S. T., Rai, V., Masi, A., Ahmad, S. M., Shah, R. A., Ganai, N. A., Agrawal, G. K., & Rakwal, R. (2017). Common bean proteomics: Present status and future strategies. *Journal of Proteomics*, 169, 239-248. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.03.019>

Zayed, M. (2010). Effect of polyethylene glycol (PEG) and sodium chloride on growth, chlorophyll, mineral ions and organic solutes contents, and enzymes activity in *Phaseolus vulgaris* seedlings. *Acta Botanica Hungarica*, 52(3-4), 429-435. <https://doi.org/10.1556/ABot.52.2010.3-4.17>

Zerpa-Catanho, D., Hernández-Pridybailo, A., Madrigal-Ortiz, V., Zúñiga-Centeno, A., Porrás-Martínez, C., Jiménez, V. M., & Barboza-Barquero, L. (2019). Seed germination of pitaya (*Hylocereus* spp.) as affected by seed extraction

- method, storage, germination conditions, germination assessment approach and water potential. *Journal of Crop Improvement*, 33(3), 372-394. <https://doi.org/10.1080/15427528.2019.1604457>
- Zhang, N., Zhang, H. - J., Zhao, B., Sun, Q. - Q., Cao, Y. - Y., Li, R., Wu, X. - X., Weeda, S., Li, L., Ren, S., Reiter, R. J., & Guo, Y. - D. (2014). The RNA-seq approach to discriminate gene expression profiles in response to melatonin on cucumber lateral root formation. *Journal of Pineal Research*, 56(1), 39-50. <https://doi.org/10.1111/jpi.12095>
- Zhang, Y., Zhou, J., Wei, F., Song, T., Yu, Y., Yu, M., Fan, Q., Yang, Y., Xue, G., & Zhang, X. (2021). Nucleoredoxin gene *TaNRX1* positively regulates drought tolerance in transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 12, 756338. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.756338>
- Zhao, J., He, Y., Weng, X., Feng, D., Ying, J., & Wang, Z. (2019). An integrated RNA-Seq and physiological study reveals gene responses involving in the initial imbibition of seed germination in rice. *Plant Growth Regulation*, 90(2), 249-263. <https://doi.org/10.1007/s10725-019-00567-2>
- Zhao, L., Zhang, H., Kohnen, M. V., Prasad, K. V. S. K., Gu, L., & Reddy, A. S. N. (2019). Analysis of Transcriptome and Epitranscriptome in Plants Using PacBio Iso-Seq and Nanopore-Based Direct RNA Sequencing. *Frontiers in Genetics*, 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00253>
- Zhou, Z.-H., Wang, Y., Ye, X.-Y., & Li, Z.-G. (2018). Signaling molecule hydrogen sulfide improves seed germination and seedling growth of maize (*Zea mays* L.) under high temperature by inducing antioxidant system and osmolyte

biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 0.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01288>