



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE  
PREGRADO

**“Caracterización de los oligosacáridos de la familia rafinosa (RFO) en variedades  
locales de *Phaseolus vulgaris*”**

Seminario de título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los  
requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**Daniela Ojeda González**

Director del seminario de título: Dra. Lee A. Meisel

Patrocinante: Dra. Claudia Stange Klein

Marzo 2022

Santiago – Chile



### INFORME DE APROBACIÓN DE SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Daniela Alejandra Ojeda González.

#### **“CARACTERIZACIÓN DE LOS NIVELES DE OLIGOSACÁRIDOS DE LA FAMILIA RAFINOSA (RFO) EN VARIEDADES LOCALES DE *PHASEOLUS VULGARIS*”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de .....

**Director Seminario de Título:** \_\_\_\_\_

#### **Comisión Revisora y Evaluadora**

**Presidente Comisión:** \_\_\_\_\_

**Evaluador:** \_\_\_\_\_

Santiago de Chile, .....

## **BIOGRAFÍA**

Mi nombre es Daniela Alejandra Ojeda González, nací en Puerto Montt el 1 de agosto de 1995, ciudad en la que viví toda mi infancia y adolescencia.

Asistí al colegio Inmaculada Concepción desde el año 2001 hasta el 2013, institución en la que cursé toda mi educación básica y media.

En el año 2014 me vine a vivir a Santiago para estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile, obteniendo la licenciatura durante el primer semestre del año 2021.

El 2018 tuve mi primer acercamiento al Laboratorio de Genética Molecular Vegetal, pero no fue hasta el primer semestre del 2019 que comencé a realizar mi Unidad de Investigación en el mencionado lugar, donde también realicé mi Seminario de Título bajo la guía de la Dra. Lee Meisel, y bajo el patrocinio de la Dra. Claudia Stange.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en especial a mi mamá, que fue la persona que me ha acompañado todos estos años, y que me inculcó toda la vida la importancia de estudiar. Con quien, si bien siempre hemos tenido altos y bajos en nuestra relación, estuvo ahí para alegrarse por mis logros aunque a mí me diese vergüenza, y siempre creyó en mí.

A mis amigas y amigos, quienes, durante todos estos años de universidad, siempre estuvimos juntos dándonos apoyo hasta que pudimos finalmente decir que lo logramos, unos antes y otros después. En especial quisiera dar las gracias al Pancho, la Caro, Gerardito, la Vicky y la Vale.

A Daniela Castillo, por las fotos de las variedades de porotos utilizadas en este trabajo, así como también a Natalia Jara, por encargarse de las preparaciones de poroto.

A ABCvital y a CEAP (Proyecto "R20F0001") por el financiamiento del proyecto.

A los integrantes del Laboratorio de Genética Molecular Vegetal, por integrarme, guiarme y ayudarme a lo largo de estos años, especialmente a Macarena y a Claudio.

Y por supuesto, también quiero agradecer infinitamente a la paciencia, apoyo y comprensión de mi tutora, la Dra. Lee Meisel. Por aceptarme en su laboratorio y confiar en mis capacidades, incluso más de lo que yo misma lo hacía.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>BIOGRAFÍA</b> .....	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>X</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
Importancia de las legumbres en términos de seguridad alimentaria y sustentabilidad .....	1
Declive en el consumo y producción de porotos a nivel nacional .....	3
Desventajas de las legumbres: Oligosacáridos de la familia rafinosa .....	4
Vía de biosíntesis de RFOs .....	6
Trabajo propuesto en el Seminario de Título .....	8
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>9</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>9</b>
General .....	9
Específicos .....	9
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>10</b>
1. Caracterización molecular de la diversidad genética de variedades locales de <i>P. vulgaris</i> .....	10
1.1. Selección de marcadores SSRs .....	10
1.2. Material vegetal y extracción de DNA genómico .....	11
1.3. Amplificación de SSRs por PCR .....	11
1.4. Análisis de electroferogramas .....	12
2. Cuantificación de niveles de oligosacáridos de la familia rafinosa .....	13
2.1. Material vegetal .....	13
2.2. Extracción de azúcares .....	15
2.3. Método de cuantificación de azúcares .....	15
2.4. Análisis estadísticos .....	16
3. Identificación de genes candidatos de la vía de biosíntesis de RFOs en <i>P. vulgaris</i> .....	16

<b>RESULTADOS</b> .....	<b>18</b>
1. Caracterización molecular de la diversidad genética de variedades locales de <i>P. vulgaris</i> .....	18
2. Cuantificación de niveles de RFO de variedades locales de <i>P. vulgaris</i> .....	28
2.1. Cuantificación de niveles de RFO tras distintos tratamientos pre-cocción y de cocción en el <i>P. vulgaris</i> variedad hallado (comercial).....	30
3. Identificación de genes candidatos de la vía de biosíntesis de RFOs en <i>P. vulgaris</i> .....	33
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>36</b>
1. Caracterización molecular de la diversidad genética de variedades locales de <i>P. vulgaris</i> .....	36
2. Cuantificación de niveles de RFO de variedades locales de <i>P. vulgaris</i> .....	39
2.1. Cuantificación de niveles de RFO tras distintos tratamientos pre-cocción y de cocción en el <i>P. vulgaris</i> variedad hallado (comercial).....	40
3. Identificación de genes candidatos de la vía de biosíntesis de RFOs en <i>P. vulgaris</i> .....	41
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>44</b>
<b>PROYECCIONES</b> .....	<b>45</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>46</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Listado de SSRs utilizados para genotipificar las 18 variedades de <i>P. vulgaris</i> .....	<b>10</b>
<b>Tabla II.</b> Variaciones alélicas entre las 18 variedades locales chilenas de <i>P. vulgaris</i> detectadas mediante el uso de SSRs. ....	<b>23</b>
<b>Tabla III.</b> Parámetros de diversidad genética entre las variedades locales chilenas de <i>P. vulgaris</i> , mediante el uso de SSRs .....	<b>25</b>
<b>Tabla IV:</b> Contenido de RFOs de la variedad comercial de <i>P. vulgaris</i> "Hallado", después de 13 tratamientos de cocción y pre-cocción .....	<b>31</b>
<b>Tabla V:</b> Putativos genes candidatos de la vía de biosíntesis de RFOs en <i>P. vulgaris</i> , identificados mediante BLASTs bidireccionales .....	<b>35</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Porotos en el territorio nacional: variaciones en su consumo aparente, producción interna y volumen importado en los últimos años .....	<b>4</b>
<b>Figura 2.</b> Estructura química de los tres principales oligosacáridos de familia rafinosa en legumbres.....	<b>5</b>
<b>Figura 3.</b> Vía de biosíntesis de RFOs.....	<b>6</b>
<b>Figura 4.</b> Germoplasma de poroto chileno .....	<b>14</b>
<b>Figura 5.</b> Detección de seis alelos con el SSR BM137 en variedades locales de <i>P. vulgaris</i> .....	<b>19</b>
<b>Figura 6.</b> Detección de seis alelos con el SSR BM143 en variedades locales de <i>P. vulgaris</i> .....	<b>20</b>
<b>Figura 7.</b> Detección de tres alelos con el SSR BM183 en variedades locales de <i>P. vulgaris</i> .....	<b>21</b>
<b>Figura 8.</b> Detección de cuatro alelos con el SSR GATS91 en variedades locales de <i>P. vulgaris</i> .....	<b>22</b>
<b>Figura 9.</b> Distribución alélica de los cuatro SSRs analizados (BM137, BM143, GATS91 y BM183) entre las 18 variedades locales chilenas de <i>P. vulgaris</i> . .....	<b>26</b>
<b>Figura 10.</b> Dendrograma de la diversidad génica de las variedades locales chilenas de <i>P. vulgaris</i> , mediante el uso de cuatro SSRs. ....	<b>27</b>
<b>Figura 11.</b> Contenido de RFOs de 18 variedades locales de granos de la especie <i>P. vulgaris</i> .....	<b>29</b>
<b>Figura 12.</b> Contenido de RFOs de 13 tratamientos de cocción y de pre-cocción sobre una variedad comercial de <i>P. vulgaris</i> (Hallado) .....	<b>32</b>



## RESUMEN

*Phaseolus vulgaris*, o poroto común, es una legumbre de gran importancia a nivel mundial; nutricionalmente, debido a su alto contenido de fibra y proteínas, bajos niveles de grasas y colesterol además de ser económicamente accesibles; y medioambientalmente, por su contribución al enriquecimiento y fertilidad de los suelos. Sumado a ello, es una especie ampliamente diversa a lo largo de América, donde solo en Chile se encuentran más de 200 variedades distintas que no han sido estudiadas en detalle.

Actualmente hay una creciente necesidad de reemplazar (como mínimo de forma parcial) la proteína de origen animal por la de origen vegetal, en favor de la salud tanto humana como medioambiental. *P. vulgaris* constituye una buena fuente de proteína vegetal, fibra y minerales, a la vez que su producción presenta un mayor índice de conversión proteico, y menor huella hídrica y de carbono que la producción de alimentos de origen animal.

Sin embargo, su consumo a nivel nacional ha ido en declive con el paso de los años, por razones tanto culturales como fisiológicas asociadas a su ingesta, esto último a causa de los llamados factores anti-nutricionales. Entre los mencionados se encuentran los factores asociados a flatulencia, que corresponden a oligosacáridos de la familia rafinosa (RFOs). La vía de biosíntesis de los RFOs en *P. vulgaris* no se encuentra descrita en detalle en la literatura.

Por estas razones *P. vulgaris* constituye un blanco interesante para un análisis de diversidad genética, así como también para una caracterización del contenido de RFOs por variedad local. Dentro del marco de este seminario de título se analizó la diversidad genética y cuantificó los niveles de RFOs de variedades locales de *P. vulgaris*

pertenecientes al banco de germoplasma de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile. Se caracterizó la diversidad genética de 18 variedades locales mediante el uso de marcadores moleculares, y se cuantificó el contenido de RFOs de sus granos utilizando un método de cuantificación colorimétrico. Los resultados indicaron que hay poca diversidad genética en esta colección de *P. vulgaris* ( $H_o=0,1$ ). Con respecto al contenido de RFOs, cuatro de 18 variedades locales escapan de los valores agrupados dentro de la desviación estándar. Por un lado, se encuentra Cranberry (6,353 mmol/100g), por el extremo superior de los datos; mientras que Juanita (4,421 mmol/100g), Bio Bio (4,145 mmol/100g) y Orfeo (3,31 mmol/100g) están por el extremo inferior.

Mediante BLASTs bidireccionales realizados en contra del genoma de *Arabidopsis* y de distintas fabáceas, se identificaron en total siete posibles genes ortólogos en el genoma de *P. vulgaris* que codifican para las enzimas de la vía de biosíntesis de RFOs. Los códigos de acceso de estos genes son los siguientes: PHAVU\_001G215300g, PHAVU\_001G223700g, y PHAVU\_007G203400g en el caso de *GoS*; PHAVU\_009G175400g, PHAVU\_004G007100g y PHAVU\_008G282600g para *RafS*; y PHAVU\_001G214300g para *StS*.

Los resultados obtenidos en este estudio dan cuenta de la diversidad a nivel tanto genotípico como fenotípico de las variedades trabajadas. Esta información en conjunto con lo que se obtuvo sobre los genes de la vía, abren las puertas para estudios sobre cómo es regulada la biosíntesis de RFOs en la especie *P. vulgaris*, y como la diversidad genética afecta la acumulación de RFOs en las variedades chilenas de poroto.

## ABSTRACT

*Phaseolus vulgaris*, also known as the common bean, is a pulse of great importance worldwide; nutritionally, due to its high fiber and protein content, low fat and low cholesterol levels as well as its economic accessibility; and environmentally, since it contributes to the enrichment and fertility of soils. In addition to this, it is a very diverse species throughout the Americas, where there are more than 200 landraces just in Chile that have not been studied in detail.

Currently there is a growing need to replace (at least partially) animal protein to plant protein, in favor of both human and environmental health. *P. vulgaris* is a good source of plant protein, fiber, and minerals, while its production has a higher protein conversion rate, and a lower water and carbon footprint than the production of foods of animal origin.

However, bean consumption at a national level has declined over the years, for both cultural and gastrointestinal reasons, the latter due to the so-called anti-nutritional factors. Among these are flatulence factors, which are associated with the levels of raffinose-family oligosaccharides (RFOs). The biosynthetic pathway of RFOs in *P. vulgaris* is still poorly described in the literature.

For these reasons, *P. vulgaris* constitutes an interesting target for a genetic diversity analysis, as well as for a characterization of the RFOs content by landrace. Within the framework of this thesis 18 *P. vulgaris* landraces were analyzed, characterizing their genetic variability through SSR molecular markers, and determining each landrace RFO content through a colorimetric quantification method. Results indicated that there is little genetic diversity in this collection of *P. vulgaris* ( $H_o=0,1$ ). Regarding the RFO content, four out of 18 landraces fall outside the grouped values within the standard deviation.

These are Cranberry (6,353 mmol/100g) on the upper end of the data; and Juanita (4,421 mmol/100g), Bio Bio (4,145 mmol/100g) and Orfeo (3,31 mmol/100g) on the lower end.

Through bidirectional BLASTs performed between *P. vulgaris* genome against *A. thaliana* as well as several *Fabaceae* family species genomes, a total of seven putative orthologous genes were identified in *P. vulgaris* genome that encode for the enzymes of the RFO biosynthesis pathway. The accession IDs of these genes are the following: PHAVU\_001G215300g, PHAVU\_001G223700g, and PHAVU\_007G203400g for Galactinol Synthase (*GoS*); PHAVU\_009G175400g, PHAVU\_004G007100g and PHAVU\_008G282600g for Raffinose Synthase (*RafS*); and PHAVU\_001G214300g for Stachyose Synthase (*StS*).

The results obtained in this study account for the diversity at both the genotypic and phenotypic levels of the landraces worked on. This, together with the information obtained about the genes of the pathway, can lead to future studies on how the RFOs biosynthesis pathway is regulated in the *P. vulgaris* species, and how the genetic diversity affects the RFOs accumulation in Chilean landraces of *P. vulgaris*.

## INTRODUCCIÓN

*Phaseolus vulgaris*, o poroto común, es una planta herbácea anual de origen mesoamericano (Bitocchi y col., 2012) y andino (Chacón y col., 2005), capaz de autopolinizarse, y perteneciente a la familia *Fabaceae*. Es una especie diploide con 11 cromosomas ( $2n=22$ ), con un genoma de aproximadamente 521 Mb, con 28.134 genes codificantes, y 33.910 transcritos de RNA (Howe y col., 2019). Sus granos han sido ampliamente consumidos a nivel mundial, con especial énfasis en regiones en vías de desarrollo como Latinoamérica y África, esto gracias a su contenido nutritivo y accesibilidad económica.

### **Importancia de las legumbres en términos de seguridad alimentaria y sustentabilidad**

Durante la Cumbre Mundial sobre la Alimentación llevada a cabo en 1996 en Roma, Italia, y convocada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, se definió que se ha alcanzado la seguridad alimentaria cuando toda la población, en cualquier momento, tiene acceso físico y económico a alimento suficiente, seguro y nutritivo, que sea capaz de cumplir con las necesidades y preferencias alimentarias de cada individuo para una vida activa y saludable (FAO, 1996). Bajo este concepto, las legumbres son consideradas alimentos valiosos, constituyendo, por un lado, una buena fuente de proteína vegetal, fibra y de micronutrientes como zinc, hierro, potasio, magnesio y vitamina B (Calles y col., 2019); mientras que al mismo tiempo presentan bajos niveles de sodio y grasas, están libres de colesterol y gluten, cuentan con un bajo índice glicémico (Singh y col., 2020), e incluso se ha reportado que su consumo ayuda a prevenir enfermedades como el cáncer de colon (Feregrino-Pérez y col., 2008). Esto convierte a las legumbres en un alimento ideal para combatir problemas

como el hambre y la desnutrición, como también enfermedades asociadas a la malnutrición como la obesidad y enfermedades cardiovasculares (Rebello y col., 2014).

Asimismo, es importante destacar que las legumbres son consideradas alimentos sustentables y amigables con el medio ambiente. Su huella de carbono es menor que la de otros cultivos como los cereales (Tongwane y col., 2016), debido a su menor requerimiento de fertilizantes nitrogenados. El uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos es considerado necesario para aumentar el rendimiento de la cosecha (Smil, 2011) y así poder suplir las necesidades alimentarias de una población mundial en crecimiento constante (que se estima alcanzará los diez billones hacia el 2050) (UN, 2017). Sin embargo, la producción y utilización de estos fertilizantes resulta perjudicial para el medio ambiente puesto que son uno de los principales contribuyentes a la emisión de gases de efecto invernadero en la producción de cultivos vegetales (Smil, 2011). Las legumbres, al ser de la familia de las leguminosas (*Fabaceae*), son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico en los suelos gracias a su relación simbiótica con bacterias del género *Rhizobium*, contribuyendo al enriquecimiento y fertilidad de la tierra, y requiriendo así un uso menor de fertilizantes nitrogenados sintéticos, tanto para su propio cultivo como para los que le siguen (en caso de estar insertos en sistemas de rotación de cultivos) (Cerquiglini y col., 2016).

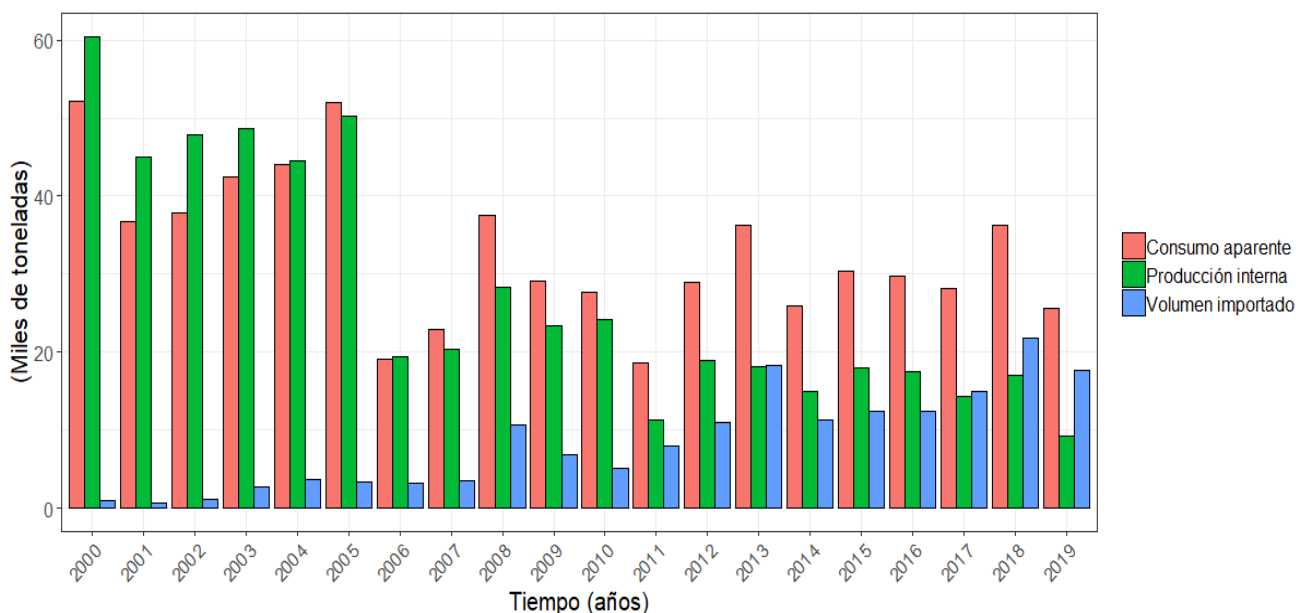
Una dieta enfocada en alimentos de origen vegetal, con una disminución considerable en el consumo de alimentos de origen animal, es entonces beneficiosa tanto para la salud humana como para la medioambiental. Sin embargo, la dieta a la que muchos países aspiran es la denominada *dieta occidental*, la cual tiene una demanda alta de alimentos de origen animal: carnes rojas, procesadas, productos lácteos altos en grasas, huevos, mantequillas, etc. Esto supone un gran problema considerando el crecimiento

de la población, puesto que la industria ganadera tiene un muy bajo rendimiento de producción proteica. La eficiencia de la conversión proteica se define como el porcentaje de proteína utilizado como alimento para el ganado que, efectivamente, se convierte en un producto animal comestible. Esta es, en el mejor de los casos, de un 25% para los huevos, y de apenas un 3,8% para la carne de res (Alexander y col., 2016), lo que significa que un mínimo de un 75% de la proteína original se pierde en el proceso de mantención y crecimiento del animal. Sumado a ello, el ganado no solo es un gran contribuyente a la producción de gases de efecto invernadero, constituyendo un 14,5% de todas las emisiones de gases de efecto invernadero antropogénicas (FAO, 2013), sino que además su alimentación abarca gran parte del suelo arable y requiere grandes cantidades de agua. En el caso de los bovinos, la huella hídrica por gramo de proteína es seis veces mayor que la de las legumbres (Mekonnen & Hoekstra, 2010).

### **Declive en el consumo y producción de porotos a nivel nacional**

Con el pasar del tiempo, y con mayor énfasis en los últimos 15 años, tanto el consumo como la producción de porotos en Chile han disminuido notoriamente (**Figura 1**). Esto se debe al incremento en los costos de producción, y al desincentivo de la siembra por el aumento de las importaciones (ODEPA, 2021a), sumado también al desplazamiento del uso del terreno desde cultivos de porotos, hacia cultivos de frutales en las regiones del Maule y Bío-Bío (ODEPA, 2021b, c) (**Figura S1**). En Chile, aproximadamente el 80% de la producción de legumbres está dada por el trabajo de agricultores pequeños e independientes en la zona centro-sur del país, pero es un rubro que no resulta rentable debido a los bajos precios de las legumbres en el extranjero, lo que favorece las importaciones por sobre la producción nacional. Sumado a ello, el bajo nivel tecnológico y la escasez de mejoramiento genético de cultivares en Chile (pues no está al alcance

de los pequeños agricultores) no permite mejorar el rendimiento (ODEPA, 2021a, b), por lo que el aumento de los costos no ha podido ser suplido con una mayor producción.



**Figura 1. Porotos en el territorio nacional: variaciones en su consumo aparente, producción interna y volumen importado en los últimos años.** Este gráfico fue elaborado a partir de los datos obtenidos de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, de los últimos 20 años (ODEPA. 2021a, b).

Con respecto a la disminución del consumo de legumbres, esto se debe tanto a factores socioculturales, como el hecho de que las legumbres han sido consideradas como “*la carne de los pobres*”, o como ya se mencionó, la aspiración a la dieta occidental, o el simple acceso a otro tipo de proteínas. Sumado a ello, un factor que también desfavorece el consumo de legumbres son los malestares que puede causar su ingesta.

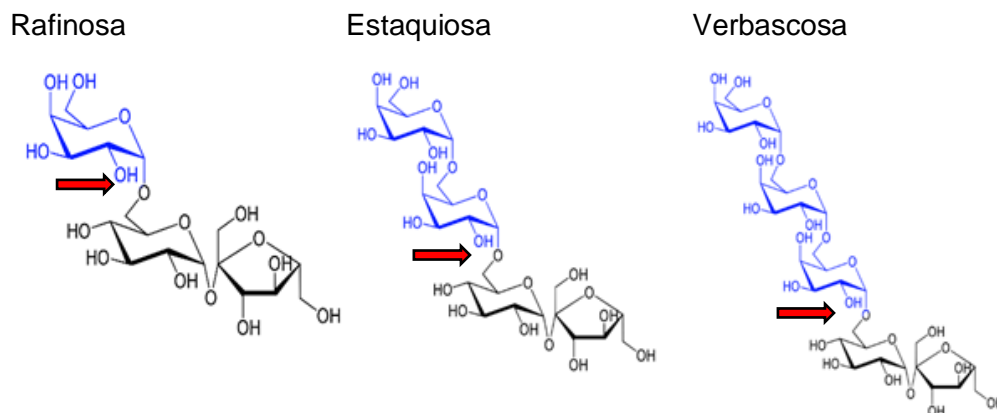
### **Desventajas de las legumbres: Oligosacáridos de la familia rafinosa**

Una de las razones que ha influido en la disminución del consumo de porotos, son las sustancias químicas de efectos indeseados que sintetiza, también conocidos como factores antinutricionales. Ácido fítico, inhibidores de enzimas, taninos, lectinas y



oligosacáridos de la familia rafinosa; todos los mencionados desfavorecen el atractivo de esta legumbre, ya sea porque reducen la biodisponibilidad de ciertos nutrientes, dificultan la degradación de proteínas, o producen efectos adversos tras la ingesta, como es el caso en particular de los oligosacáridos de la familia rafinosa, conocidos por provocar hinchazón y flatulencias en humanos (Shimelis & Rakshit, 2005).

Los oligosacáridos de la familia rafinosa o “RFO”, son azúcares que tienen en común un esqueleto de rafinosa, trisacárido constituido por galactosa, glucosa y fructosa, estas últimas unidas por un enlace  $\alpha$ -1,2-glicosídico, conformando una unidad de sacarosa. La galactosa se encuentra unida a la glucosa mediante un enlace  $\alpha$ -1,6-glicosídico, y dependiendo de cuantas extensiones de galactosa estén presentes, se dará origen a distintos oligosacáridos (**Figura 2**). Los más abundantes en semillas son el trisacárido rafinosa, el tetrasacárido estaquiosa y el pentasacárido verbascosa (Kuo y col., 1988), los cuales actúan como reservas de galactosa y contribuyen al desarrollo de la planta durante la etapa de germinación temprana (Blöchl y col., 2007).

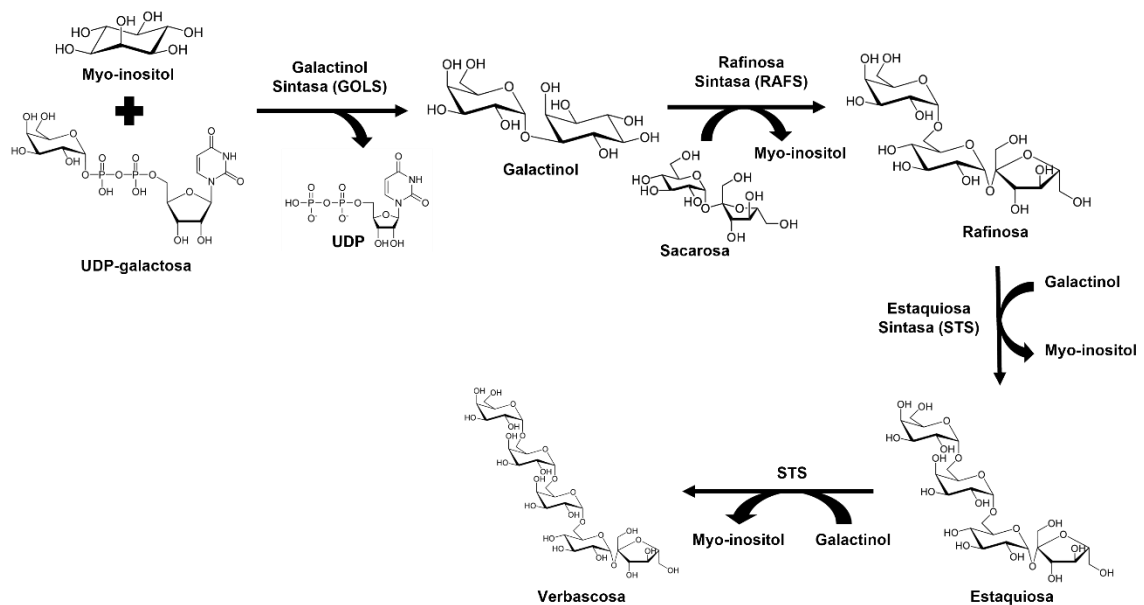


**Figura 2. Estructura química de los tres principales oligosacáridos de familia rafinosa en legumbres.** En azul se muestran las unidades de galactosa, y en negro las de sacarosa. Las flechas rojas indican el

enlace  $\alpha$ -D-1,6-glicosídico entre galactosa y glucosa, que es hidrolizado bajo la acción de la  $\alpha$ -galactosidasa (Imagen modificada a partir de Jorge y col., 2017).

La enzima  $\alpha$ -galactosidasa es la que se encarga de hidrolizar el enlace  $\alpha$ -1,6-glicosídico que une a galactosa y glucosa. Sin embargo, esta enzima no se encuentra en cantidades suficientes en el tracto digestivo superior de animales monogástricos como los humanos (Suarez y col., 1999). A causa de esto, los RFOs llegan intactos hasta el colon, donde son fermentados por bacterias de la microbiota intestinal, reacción que libera  $\text{CO}_2$ , metano e hidrógeno, gases que finalmente son los que causan la hinchazón y flatulencias que caracterizan el consumo de estos alimentos (Naczki y col., 1997).

### Vía de biosíntesis de RFOs



**Figura 3. Vía de biosíntesis de RFOs.** Se muestra la estructura química de todos los sustratos, en conjunto con las enzimas involucradas en cada paso de la vía.

La biosíntesis de RFOs está mediada por la acción de enzimas galactosiltransferasas. El primer paso de esta vía es la síntesis de galactinol, un compuesto formado a partir de

la transferencia del grupo galactosil de la UDP-galactosa hacia el L-myo-inositol, mediante la acción de la enzima inositol-3- $\alpha$ -galactosiltransferasa, también conocida como galactinol sintasa (GOLS; EC. 2.4.1.123). Esta enzima tiene una masa atómica de aproximadamente 40 kDa, y su pH óptimo se encuentra entre 7,0 y 7,5 (Smith y col., 1991; Liu y col., 1995). La síntesis de galactinol es clave para entrar en esta vía de biosíntesis, pues este galactósido es el que actúa como el donante del grupo galactosil en reacciones posteriores.

La siguiente reacción en la vía está mediada por la enzima galactinol-sacarosa galactosiltransferasa o rafinosa sintasa (RAFS; EC.2.4.1.82), de masa atómica de aproximadamente 90 kDa y un pH óptimo entre 6,5 y 7,0 (Li y col., 2007). Esta enzima es la que se encarga de transferir el motivo galactosil desde el galactinol hacia una molécula de sacarosa, formando así el trisacárido rafinosa y liberando inositol en el proceso. Tiene una alta especificidad hacia la sacarosa como aceptor del grupo galactosil, razón por la cual no es capaz de participar en la síntesis de RFOs de mayor grado de polimerización (Peterbauer & Richter, 2001).

La última enzima participante en la vía es la galactinol-rafinosa galactosiltransferasa o estaquiosa sintasa (STS; EC. 2.4.1.67), de masa atómica entre 85 y 95 kDa, y con un pH óptimo entre 6,5 y 7,0 (Richter y col., 2000). Si bien esta enzima se encarga principalmente de la transferencia del motivo galactosa desde el galactinol hacia una molécula de rafinosa, formando así el tetrasacárido estaquiosa, se ha reportado que tiene una amplia especificidad de sustrato, pudiendo utilizar al galactopinitol A, galactosil ononitol, e incluso otra molécula de rafinosa como donantes del grupo galactosil. Del mismo modo, también puede usar como aceptores al myo-inositol, ononitol y pinitol, e incluso a la propia estaquiosa para así formar verbascosa (Peterbauer & Richter, 2001).

## **Trabajo propuesto en el Seminario de Título**

Hasta la fecha, los principales estudios realizados en legumbres se concentran en aumentar su rendimiento, dejando de lado su valor nutricional y propiedades organolépticas. Sumado a esto, en Chile hay al menos 200 variedades locales de *P. vulgaris* (Manzur y col., 2016), pero su gran mayoría pasa desapercibida para la población chilena. Por estos motivos es que en este trabajo se busca entregar datos y evidencia que pueda utilizarse para incentivar el consumo de porotos, caracterizando la diversidad de las variedades locales pertenecientes al banco de germoplasma de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile tanto a nivel genético como en términos de RFOs. Por otro lado, los genes implicados en la vía de biosíntesis de RFOs no han sido descritos exhaustivamente en porotos, y su identificación podría abrir también las puertas para una producción de porotos con menor contenido de oligosacáridos.

## **HIPÓTESIS**

La colección de variedades locales de *Phaseolus vulgaris* pertenecientes al banco de germoplasma de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile son genéticamente diversas y presentan variabilidad en sus niveles de oligosacáridos de la familia rafinosa (RFOs).

## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar la diversidad genética y la acumulación de RFOs en las variedades locales de *Phaseolus vulgaris* pertenecientes al banco de germoplasma de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, e identificar los genes implicados en la biosíntesis de los RFOs.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Caracterizar las variedades locales de *P. vulgaris* del banco de germoplasma vivo de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, mediante el uso de marcadores moleculares tipo SSR.
- 2) Determinar la acumulación del conjunto de oligosacáridos: rafinosa, estaquiosa y verbascosa, en las variedades locales de *P. vulgaris* del banco de germoplasma de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile
- 3) Identificar genes candidatos que participan en la vía biosintética de RFOs en el genoma de *P. vulgaris*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Caracterización molecular de la diversidad genética de variedades locales de

#### *P. vulgaris*

#### 1.1 Selección de marcadores SSRs

Se realizó una búsqueda bibliográfica de SSRs previamente descritos por otros autores en el género *Phaseolus*. A partir de esto se mandó a fabricar diez pares de partidores que amplificaban para los siguientes microsatélites: PV-AT001 (Yu y cols., 1999); BM183, BM210, BM172, PV-AT007 (Gaitán-Solis y cols., 2002); BM137, BM143, BM152, BM160, GATS91 (Blair y cols., 2003 & 2006).

**Tabla I. Listado de SSRs utilizados para genotipificar las 18 variedades de *P. vulgaris*.** F: Forward; R: Reverse.

SSR	Secuencia repetitiva	Secuencia de los partidores (5'->3')	Referencia	Tamaño esperado (pb)
<b>BM137</b>	(CT)33	F – CGCTTACTCACTGTACGCACG R – CCGTATCCGAGCACCGTAAC	Blair et al. 2006	155
<b>BM210</b>	(CT)15	F – ACCACTGCAATCCTCATCTTTG R – CCCTCATCCTCCATTCTTATCG	Gaitan-Solis et al. 2002	166
<b>BM183</b>	(TC)14	F – CTCAAATCTATTCACCTGGTCAGC R – TCTTACAGCCTTGCAGACATC	Gaitan-Solis et al. 2002	149
<b>BM143</b>	(GA)35	F – GGGAAATGAACAGAGGAAA R – ATGTTGGGAACCTTTTAGTGTG	Blair et al. 2003 & 2006	143
<b>BM152</b>	(GA)31	F – AAGAGGAGGTCGAAACCTTAAATCG R – CCGGGACTTGCCAGAAGAAC	Blair et al. 2003 & 2006	127
<b>BM160</b>	(GA)15(GAA) 5	F – CGTGCTTGGCGAATAGCTTTG R – CGCGTTCTGATCGTGACTTC	Blair et al. 2003 & 2006	211
<b>GATS91</b>	(GA)17	F – GAGTGCGGAAGCGAGTAGAG R – TCCGTGTTCTCTGTCTGTG	Blair et al. 2003 & 2006	229
<b>PV-AT001</b>	(AT)22	F – GGGAGGGTAGGGAAGCAGTG R – GCGAACCACGTTTATGAATGA	Yu et al. 1999	---
<b>BM172</b>	(GA)23	F – CTGTAGCTCAAACAGGGCACT R – GCAATACCGCCATGAGAGAT	Gaitan-Solis et al. 2002	107
<b>PV-AT007</b>	(AT)12	F – AGTTAAATTATACGAGGTTAGCCTAAATC R – CATTCCCTTCACACATTCACCG	Gaitan-Solis et al. 2002	192

## 1.2 Material vegetal y extracción de DNA genómico

Se trabajó con 18 variedades locales de *P. vulgaris* (**Figura 3**) pertenecientes al banco de germoplasma vivo de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. El material vegetal analizado fue foliar, y estuvo almacenado a -80 °C para su correcta preservación. La extracción de DNA se llevó a cabo utilizando el Qiagen DNeasy Plant Minikit, siguiendo el procedimiento descrito en el manual asociado.

Tras esto, se utilizó el espectrofotómetro TECAN NanoQuant Infinite M200 Pro para cuantificar el DNA extraído a 260 nm de longitud de onda.

## 1.3 Amplificación de SSRs por PCR

Para comprobar que las condiciones de amplificación fuesen las adecuadas, se realizaron pruebas previas, utilizando partidores forward y reverse sin modificar. Los productos de PCR obtenidos a partir de este procedimiento fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa. El gel de agarosa se encontraba al 1,8%, el buffer utilizado fue TAE 1X, y el gel se corrió a 90 V durante 1 hora. Posteriormente los resultados fueron visualizados bajo luz UV en un trans-iluminador.

Para obtener productos de PCR marcados fluorescentemente, se siguió la estrategia propuesta por Schuelke (2000), en la cual se utiliza un set de 3 partidores por reacción: un partidor forward modificado, que tiene unido una cola M13 (5'-TGAAAACGACGGCCAGT-3') a su extremo 5', un partidor reverse, y finalmente una cola M13 (5'-TGAAAACGACGGCCAGT-3') marcada con un fluoróforo (PET o FAM), con el objetivo de que la M13 marcada se incorpore a los productos finales. Teniendo esto en consideración, cada reacción de PCR se preparó en un volumen final de 20 µL, utilizando 20 ng de DNA templado, 1U de BIOLASA DNA-Polimerasa, buffer 1X, 0,4 mM

de dNTPs (a partir de un stock que contenía los 4 dNTPs: A, C, G y T), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 μM del partidor forward-M13, 0,8 μM del partidor reverse (secuencias de ambos presentadas en la **Tabla I**) y 0,8 μM de la cola M13 marcada. La concentración y proporción de los partidores utilizados fueron anteriormente determinadas por Oblessuc y cols. (2009) como la más eficiente entre cuatro combinaciones distintas. Cada ronda de amplificación se llevó a cabo junto a un control negativo.

El programa de amplificación utilizado fue: iniciación a 94 °C x 1 min; 30 ciclos (94 °C x 1 min; 55 °C x 1 min; 72 °C x 1 min); 8 ciclos (94 °C x 1 min; 53 °C x 1 min; 72 °C x 1 min); y una extensión final a 72 °C x 10 min, el cual había sido previamente utilizado por Oblessuc y cols. (2009).

Los productos de PCR fluorescentes fueron posteriormente colocados en placas de 96 pocillos y enviados al servicio de electroforesis capilar de la Unidad de Secuenciación de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

#### **1.4 Análisis de electroferogramas**

Los resultados obtenidos del análisis por electroforesis capilar fueron entregados a través de correo electrónico por la Unidad de Secuenciación de la Pontificia Universidad Católica de Chile en formato gráfico, como electroferogramas. Los electroferogramas fueron analizados utilizando el *software* PeakScanner v.2, con el cual se determinó el tamaño de cada alelo presente en cada variedad; y posteriormente validados utilizando el *software* Micro-Checker v.2.2.3. ML-Null Freq fue utilizado para el cálculo de la frecuencia de alelos nulos en la población estudiada. Los parámetros genéticos: número efectivo de alelos ( $N_e$ ), heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), e índice de Wright ( $F_{is}$ ) fueron calculados con el *software* PopGene v.1.32. Los gráficos



de frecuencia alélica fueron hechos en GraphPad Prism 6 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

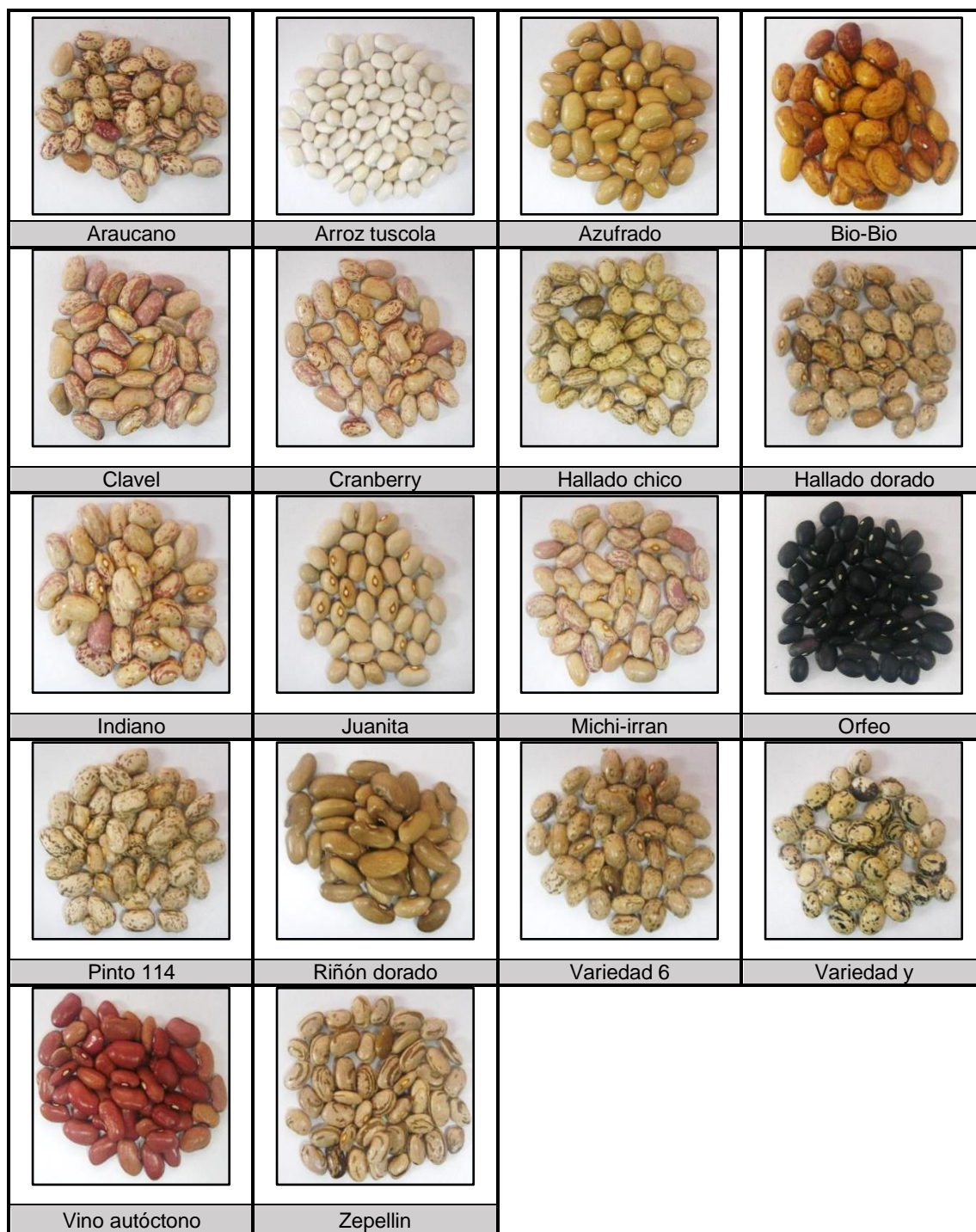
Se generó una matriz en Excel en la cual se presentan todos los alelos de cada variedad; en caso de no haber amplificación se marcó con "0". Esta matriz fue importada al *software* DARWin v.6.0.21 (Perrier & Jacquemoud-Collet, 2006), con el cual se generó un dendrograma, utilizando el "método de unión de vecinos" o *Neighbor Joining* (NJ).

## **2. Cuantificación de niveles de oligosacáridos de la familia rafinosa**

### **2.1 Material vegetal**

Para cuantificar los RFOs tanto de las variedades locales (**Figura 4**) como de los tratamientos cocción y pre-cocción (**Tabla IV**), se trabajó a partir de grano de *P. vulgaris*, los cuales fueron reducidos a harina mediante distintos procesos de molienda. Las variedades locales se encontraban a 4 °C previo a la molienda, luego fueron pulverizadas utilizando una máquina para triturar granos de café, y tras ello se almacenaron en tubos Eppendorf de 2 mL a temperatura ambiente.

En el caso de los granos sometidos a distintos tratamientos de cocción y pre-cocción, estos tenían un mayor contenido de agua debido a la naturaleza de las preparaciones, razón por la cual se almacenaron a -20 °C. Para la molienda se utilizó el molinillo IKA A11 *Basic* en presencia de nitrógeno líquido, y la harina resultante fue almacenada en tubos Falcon de 50 mL a -20 °C.



**Figura 4. Pequeña colección de germoplasma de poroto chileno.** Se observan las 18 variedades locales a analizar en el presente estudio, pertenecientes al banco de germoplasma de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile (Fotografías por Daniela Castillo).

## **2.2 Extracción de azúcares**

Para las variedades del banco de germoplasma se realizó el proceso de extracción de azúcares en tres réplicas técnicas de cada ensayo, en conjunto a un control positivo de harina de soya proporcionado por el kit Megazyme: Raffinose/Sucrose/Glucose Assay. Se utilizaron  $0,50 \pm 0,01$  g de harina de poroto de cada muestra, las que se colocaron en diferentes tubos de ensayo, se les agregó 5 mL de etanol 95% v/v en cada uno, y se incubaron en un baño de agua caliente entre 84 y 88 °C durante 5 minutos.

Tras esto, el contenido de cada tubo se traspasó a su respectivo matraz, donde se le agregó buffer acetato de sodio (50mM, pH 4,5) hasta completar 50 mL de volumen final, y se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo se agitó la mezcla y se traspasaron 5 mL de la solución a tubos de ensayo, se le agregó 2 mL de cloroformo y se mezcló en un *vortex* durante 15 segundos, para luego centrifugar a 1.000 g por 10 minutos. Finalmente se recuperó 1 mL de sobrenadante correspondiente al extracto de azúcares, el cual fue almacenado en tubos Eppendorf a 4 °C para ser utilizados dentro de los siguientes tres días.

## **2.3 Método de cuantificación de azúcares**

Para la determinación de la concentración de azúcares se utilizó el *Megazyme: Raffinose/Sucrose/Glucose Assay Kit*. El control positivo para los ensayos fue harina de soya y un control de glucosa de concentraciones conocidas, proporcionados por el kit.

Por cada solución de azúcares se realizaron tres ensayos, traspasándose alícuotas de 0,2 mL de extracto a tubos de ensayo donde fueron incubadas con 0,2 mL de buffer acetato de sodio (50mM, pH 4,5) (solución A); 0,2 mL de invertasa (solución B); y 0,2 mL de una solución de  $\alpha$ -galactosidasa e invertasa (solución C), respectivamente. Las

soluciones resultantes fueron incubadas en un baño de agua a 50 °C durante 20 minutos. Tras esto se agregó a cada solución 3 mL de reactivo GOPOD (glucosa oxidasa y peroxidasa en presencia de 4-aminoantipirina y ácido p-hidroxibenzoico), y se incubó nuevamente a 50 °C por 20 minutos. Tras esto se midió la absorbancia a 510 nm en un espectrofotómetro.

## **2.4 Análisis estadísticos**

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza de un factor (ANOVA), seguido de la prueba HSD de Tukey para comparar entre sí las variedades de *P. vulgaris*. Resultados con valores de  $p < 0,05$  fueron aceptados como estadísticamente significativos. El análisis se llevó a cabo utilizando GraphPad Prism 6 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). A partir de lo obtenido de la prueba de Tukey se realizó una matriz con todas las variedades, donde “1” significaba que no había diferencia significativa entre ese par, y “0” que sí lo había, según esto se formaron grupos de la A a la J en el caso de las variedades locales.

## **3. Identificación de genes candidatos de la vía de biosíntesis de RFOs en *P. vulgaris***

Para identificar los posibles genes implicados en la vía biosintética de RFOs en *P. vulgaris*, se realizaron BLASTs bidireccionales. En primer lugar, se buscó las secuencias aminoacídicas de las enzimas de la vía (GOLS, RAFS y STS) en *Arabidopsis thaliana* v10.1 (obtenidas a partir de TAIR, <https://www.arabidopsis.org>), *Glycine max* v2.0 (SoyBase, <https://www.soybase.org>), *Pisum sativum* y *Vigna angularis* (ambas a partir de PMN, <https://plantcyc.org> y UniProt, <https://www.uniprot.org>), organismos en los cuales una o más de las enzimas de interés se encontraban descritas en la literatura.

Con estas secuencias proteicas se realizaron tBLASTn en contra del genoma de *P. vulgaris* v1.0 utilizando la matriz de sustitución BLOSUM62, y se seleccionó como candidatos aquellos resultados que cumplieran con un e-value menor a  $10^{-20}$  y un porcentaje de identidad mayor al 60%. Tras esto, se tomó la secuencia codificante *cds* de cada candidato y se realizaron tBLASTx en contra de los genomas de las plantas utilizadas como modelo, seleccionando aquellos resultados que coinciden con las secuencias utilizadas en el primer BLAST, y que cumplieran con los parámetros establecidos con anterioridad.

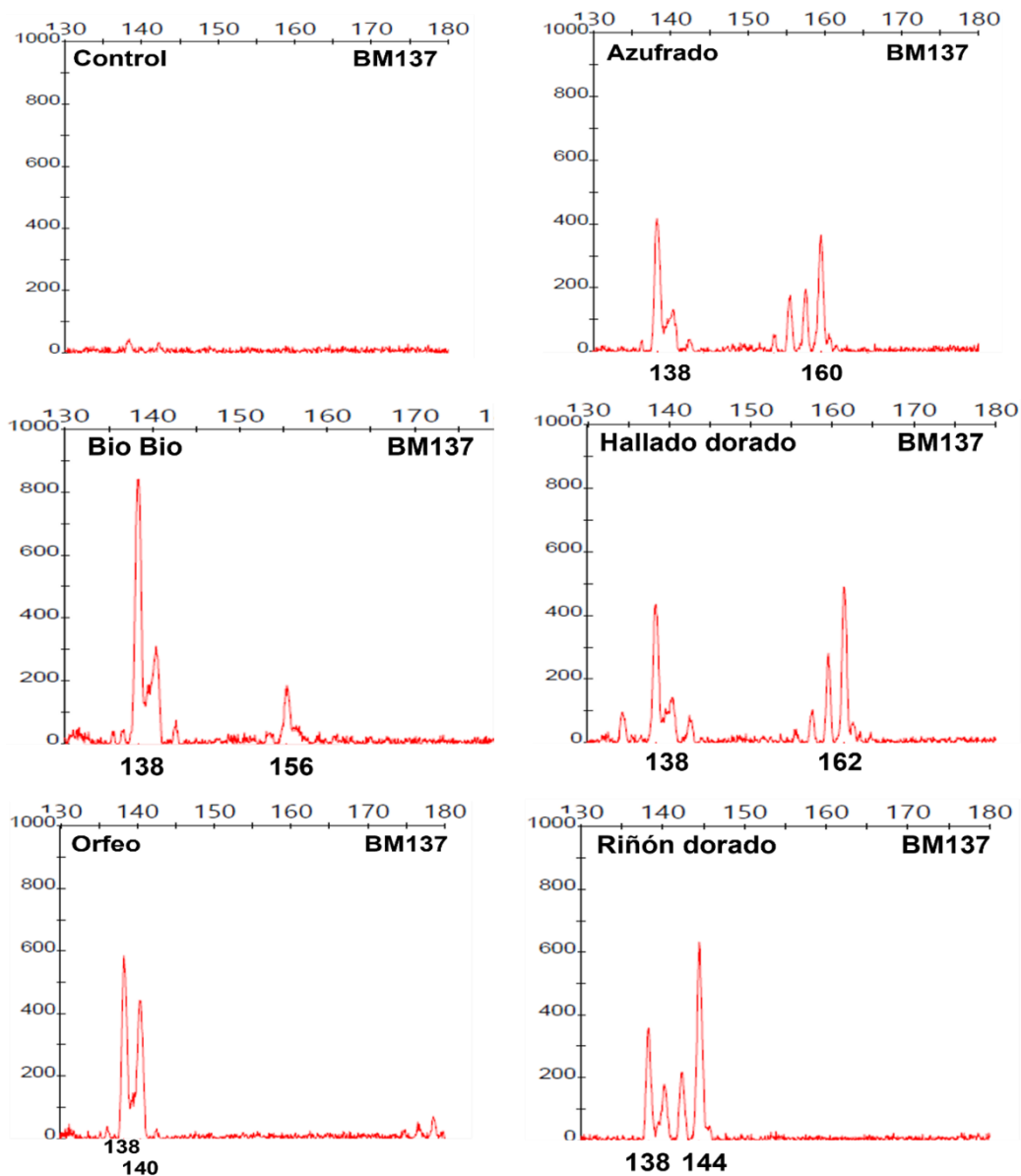
## RESULTADOS

### 1. Caracterización molecular de la diversidad genética de variedades locales de *P. vulgaris*

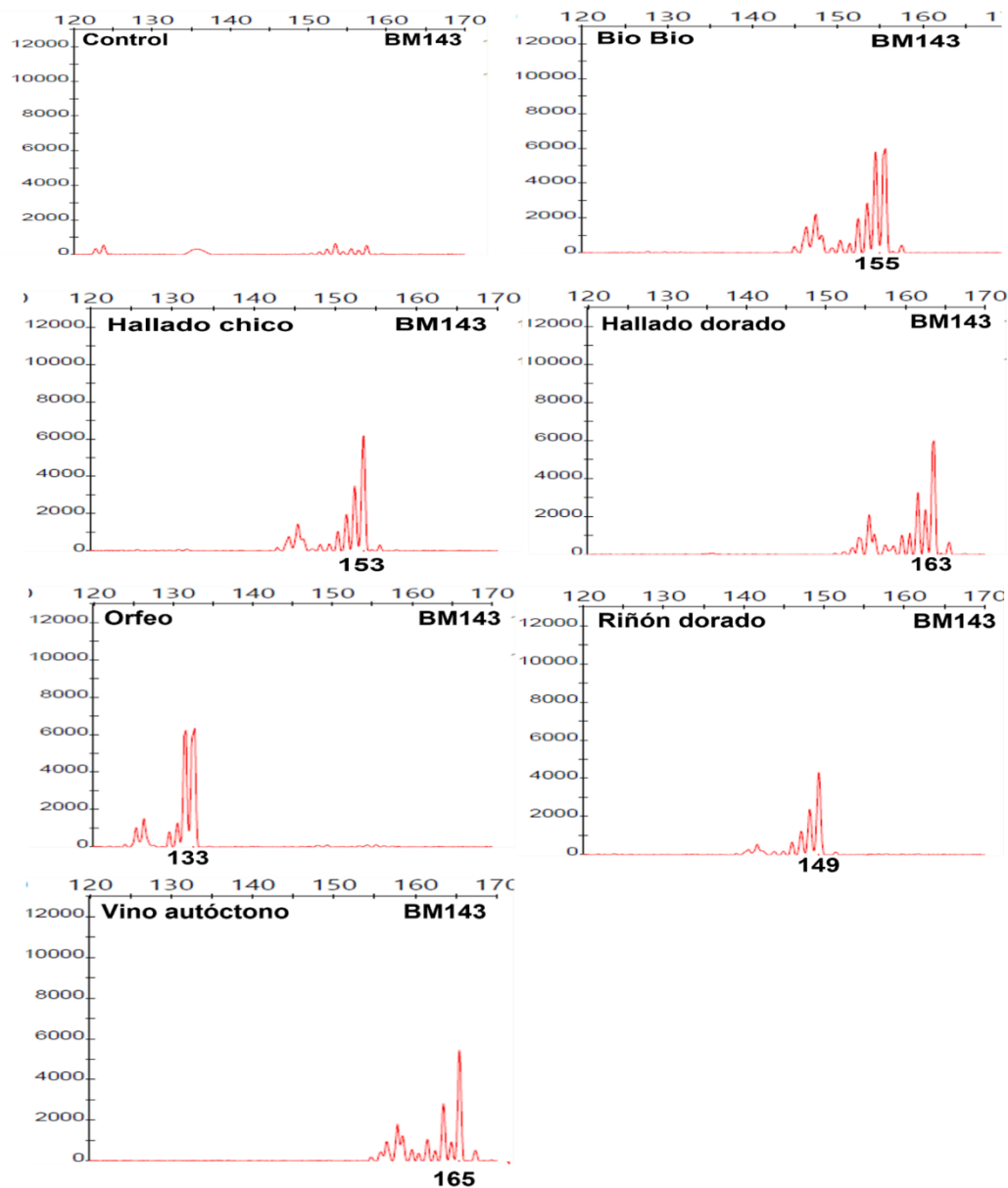
Con el propósito de determinar la diversidad génica entre las variedades locales de *P. vulgaris*, se utilizaron marcadores moleculares tipo SSR. Un total de diez SSRs fueron utilizados para genotipificar las variedades locales (**Tabla I**). De estos, los SSRs BM137, BM143, BM183 y GATS91, marcados con el fluoróforo PET, amplificaron en la mayoría de las variedades analizadas según lo arrojado por el análisis de electroforesis capilar. En contraste, los SSRs PV-AT001, PV-AT007, BM152, BM160 y BM172, marcados con el fluoróforo FAM, no presentaron peaks notables en ninguna de las variedades según lo observado en sus respectivos electroferogramas.

Por su parte, BM210 marcado con PET, amplificó únicamente en la variedad “Barbucho”, una variedad de la cual solo se contaba con material foliar, usado para realizar la extracción de DNA. No se contaba con grano, y por tanto no se le podía realizar la extracción y cuantificación del contenido de oligosacáridos, razón por la cual esta variedad fue descartada. BM210 al no amplificar en ninguna otra variedad, fue también descartado del posterior análisis de datos, junto a todos los demás SSRs que no amplificaron.

Los cuatro marcadores que amplificaron resultaron ser polimórficos, con una cantidad de alelos que varía entre 3 (BM183) y 6 (BM137 y BM143). Desde la **Figura 5** hasta la **Figura 8** se muestran algunos de los electroferogramas, dando ejemplo de todos los alelos obtenidos, visualizados utilizando el *software* Peak Scanner v.2.

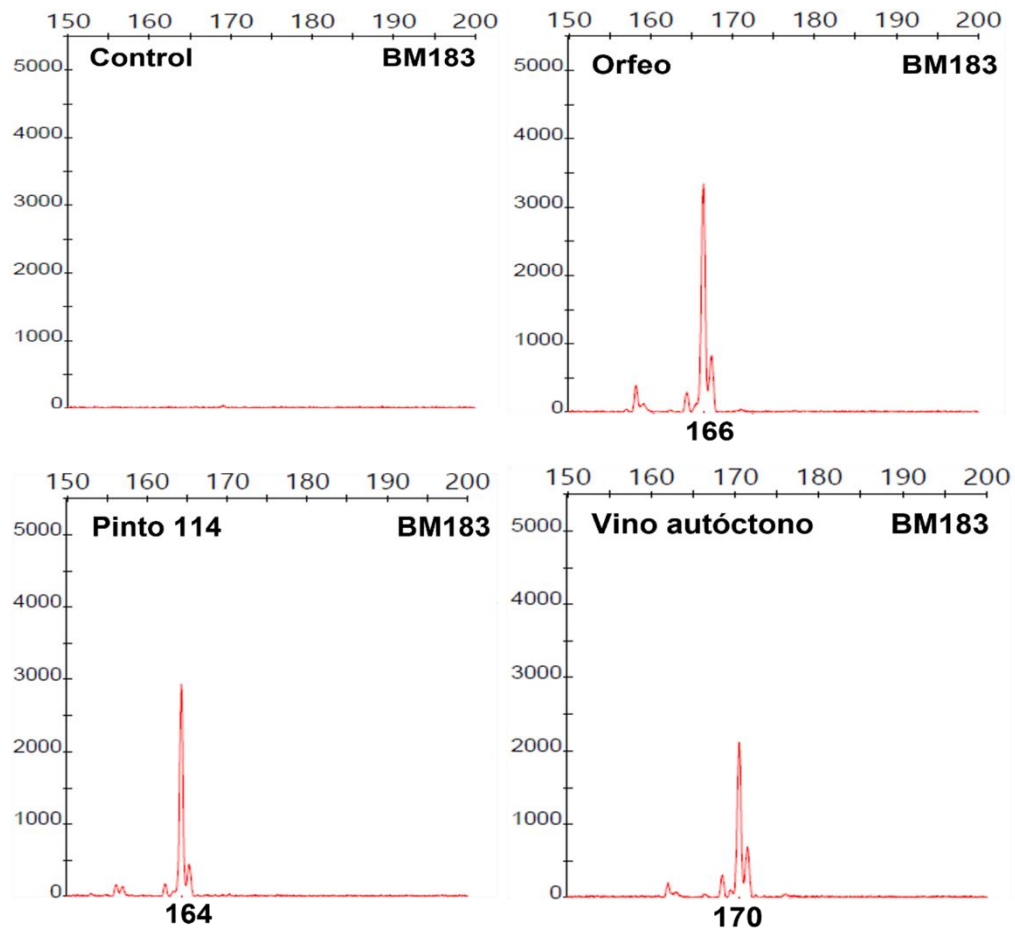


**Figura 5. Detección de seis alelos con el SSR BM137 en variedades locales de *P. vulgaris*.** Se observan los electroferogramas de este marcador en la colección analizada. Las variedades Orfeo (heterocigota, alelos de 138 y 140 pb), Riñón dorado (heterocigota, alelos de 138 y 144 pb), Bio Bio (heterocigota, alelos de 138 y 156 pb), Azufrado (heterocigota, alelos de 138 y 160 pb), Hallado dorado (heterocigota, alelos de 138 y 162 pb). El control corresponde a la reacción en la que se reemplazó el DNA templado por agua. El eje X corresponde al tamaño de los alelos en pb, y el eje Y a la intensidad de fluorescencia detectada.

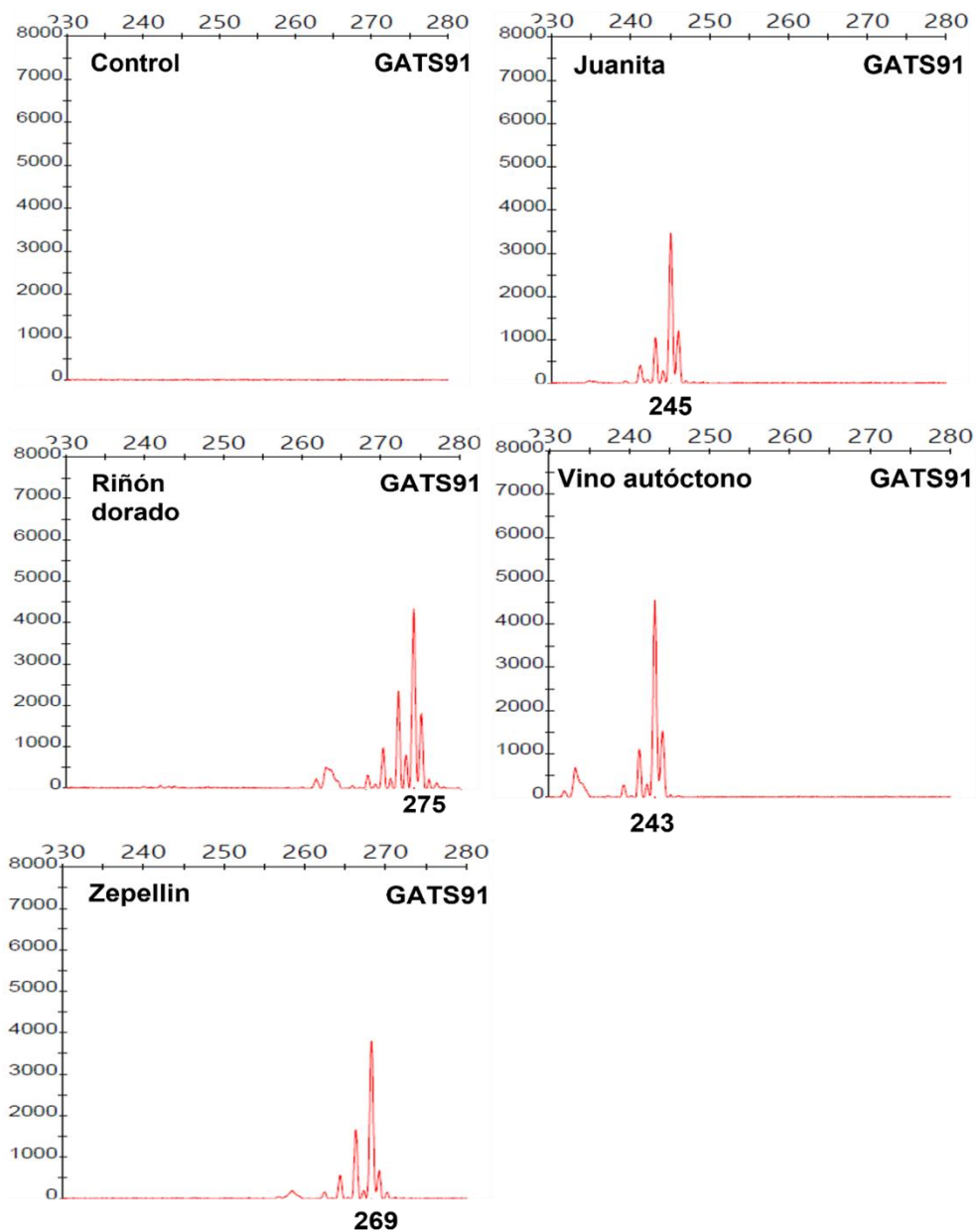


**Figura 6. Detección de seis alelos con el SSR BM143 en variedades locales de *P. vulgaris*.** Se observan los electroferogramas de este marcador en la colección analizada. Las variedades Orfeo (homocigota, alelo de 133 pb), Riñón dorado (homocigota, alelo de 149 pb), Hallado chico (homocigota, alelo de 153 pb), Bio Bio (homocigota, alelo de 155 pb), Hallado dorado (homocigota, alelo de 163 pb), y Vino autóctono (homocigota, alelo de 165 pb). El control corresponde a la reacción en la que se reemplazó el DNA templado por agua. El eje X corresponde al tamaño de los alelos y el eje Y a la intensidad de fluorescencia detectada.





**Figura 7. Detección de tres alelos con el SSR BM183 en variedades locales de *P. vulgaris*.** Se observan los electroferogramas de este marcador en la colección analizada. Las variedades Zepellin (homocigota, alelo de 164 pb), Orfeo (homocigota, alelo de 166 pb) y Bio Bio (homocigota, alelo de 170 pb). El control corresponde a la reacción en la que se reemplazó el DNA templado por agua. El eje X corresponde al tamaño de los alelos y el eje Y a la intensidad de fluorescencia detectada.



**Figura 8. Detección de cuatro alelos con el SSR GATS91 en variedades locales de *P. vulgaris*.** Se observan los electroferogramas de este marcador en la colección analizada. Las variedades Vino autóctono (homocigota, alelo de 243 pb), Juanita (homocigota, alelo de 245 pb), Zepellin (homocigota, alelo de 269 pb), y Riñón dorado (homocigota, alelo de 275 pb). El control corresponde a la reacción en la que se reemplazó el DNA templado por agua. El eje X corresponde al tamaño de los alelos y el eje Y a la intensidad de fluorescencia detectada.

**Tabla II: Variaciones alélicas entre las 18 variedades locales chilenas de *P. vulgaris* detectadas mediante el uso de SSRs.** Un resumen de las variedades locales de *P. vulgaris* analizadas y los tamaños de los alelos (pb) detectados utilizando SSRs. Tanto las variedades que se muestran en gris como las azules no pudieron ser distinguidas entre sí utilizando únicamente estos cuatro SSRs. n.a: no hubo amplificación.

Variedad	BM137 (138-162)		BM143 (133-165)		BM183 (164-170)		GAST91 (243-275)	
	Alelos (pb)		Alelos (pb)		Alelos (pb)		Alelos (pb)	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Hallado chico	138	138	153	153	170	170	243	243
Variedad y	138	138	155	155	170	170	243	243
Indiano	138	138	155	155	170	170	243	243
Clavel	138	138	155	155	170	170	243	243
Vino autóctono	138	138	165	165	170	170	243	243
Arroz tuscola	138	138	n.a	n.a	164	164	275	275
Orfeo	138	140	133	133	166	166	269	269
Riñón dorado	138	144	149	149	164	164	275	275
Bio-Bio	138	156	155	155	170	170	245	245
Araucano	138	160	155	155	170	170	243	243
Azufrado	138	160	155	155	170	170	245	245
Variedad 6	138	160	163	163	170	170	245	245
Hallado dorado	138	162	163	163	170	170	245	245
Zepellin	144	144	149	149	164	164	269	269
Pinto 114	n.a	n.a	149	149	164	164	269	269
Michi irran	n.a	n.a	155	155	170	170	243	243
Cranberry	n.a	n.a	155	155	170	170	243	243
Juanita	n.a	n.a	155	155	170	170	245	245

Se observó un total de 19 alelos distintos para los cuatro SSRs analizados, a lo largo de las 18 variedades estudiadas, con un promedio de 5 alelos por locus. BM183 y GATS91 se encuentran presentes en todas las variedades. Por otro lado, BM137 y BM143 están en la mayoría, con la excepción de BM137 en Pinto 114, Michi irran, Cranberry y Juanita; y BM143 en Arroz tuscola (**Tabla II**). BM183 fue el marcador menos polimórfico, presentando tres alelos, seguido de GATS91 con cuatro alelos, mientras que los más polimórficos fueron BM137 y BM143, ambos con seis alelos cada uno. En contraste, con

respecto a la frecuencia alélica, el más representado fue el alelo de 170 pb del marcador BM183, con una frecuencia alélica de aproximadamente un 72%, mientras que los menos representados fueron los alelos de 140, 156 y 162 pb del marcador BM137, con una frecuencia alélica de únicamente un ~3,5%. Estos datos se encuentran representados gráficamente en la **Figura 9**.

Según los resultados arrojados por *Micro-checker*, ninguno de los marcadores utilizados presentaría *dropout* de alelos grandes (definido como alelos de gran tamaño que no se amplifiquen de forma tan eficiente como los de menor tamaño). Por el contrario, según *Micro-checker*, tres de los cuatro SSRs presentan evidencia para alelos nulos, siendo estos BM143, BM183 y GATS91; la frecuencia de estos alelos nulos fue determinada mediante el uso del *software* ML-Null Freq. Considerando esto, sin incluir a BM137, en promedio se tendría una frecuencia de alelos nulos de 0,391, con un mínimo de 0,316 para BM138 y un máximo de 0,449 para BM143. Con respecto a errores por *stuttering* (definido como pequeños cambios en el tamaño de los alelos generados durante la reacción de PCR, por errores en la amplificación), solamente el marcador GATS91 presentó evidencia de tenerlos.

El número de alelos efectivos ( $N_e$ ) por locus varía entre 1,7 (BM183) y 3,2 (GATS91), con un promedio de 2,5. La heterocigosidad observada ( $H_o$ ) varía entre 0 (BM143, BM183, GATS91) y 0,5 (BM137), mientras que la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) va desde 0,4 (BM183) a 0,7 (GATS91), con valores promedio de 0,1 y 0,6, respectivamente. El índice de Wright varía entre 0 (BM137) a 1 (BM143, BM183, GATS91), con un promedio de 0,8. Todos estos datos se encuentran ordenados en la **Tabla III**.

**Tabla III. Parámetros de diversidad genética entre las variedades locales chilenas de *P. vulgaris*, mediante el uso de SSRs.** N: Número de alelos; Ne: número de alelos efectivos; Fnull: frecuencia de alelos nulos; Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada de Nei; PIC: contenido de información polimórfica; Fis: índice de Wright.

SSR	N	Ne	Fnull	Ho	He	PIC	Fis
<b>BM137</b>	6	2,1	---	0,5	0,5	0,5	0
<b>BM143</b>	6	3,0	0,4	0	0,7	0,6	1
<b>BM183</b>	3	1,7	0,3	0	0,4	0,4	1
<b>GATS91</b>	4	3,2	0,4	0	0,7	0,6	1
<b>Promedio</b>	4,8	2,5	0,4	0,1	0,6	0,5	0,8
<b>Desviación estándar</b>	1,5	0,7	0,1	0,3	0,1	0,1	0,5

Para los SSRs BM137, BM143 y BM183, se observa la presencia de un alelo notoriamente más representado, 138, 155 y 170 respectivamente, con una frecuencia alélica superior al 50%, mientras que todo el resto tiene frecuencias que oscilan entre un 3 y un 18%. En el caso de GATS91, si bien es notorio que el alelo 243 es el más representado (~44%), su distribución es más homogénea que en los demás (**Figura 9**).

Con la información alélica recopilada se realizó una matriz que contenía toda la información de los SSRs para cada variedad, la cual se ingresó al *software* DARWin v.6.0.21, y con ella se generó un dendrograma mediante el método de agrupamiento *Neighbor Joining* (**Figura 10**).

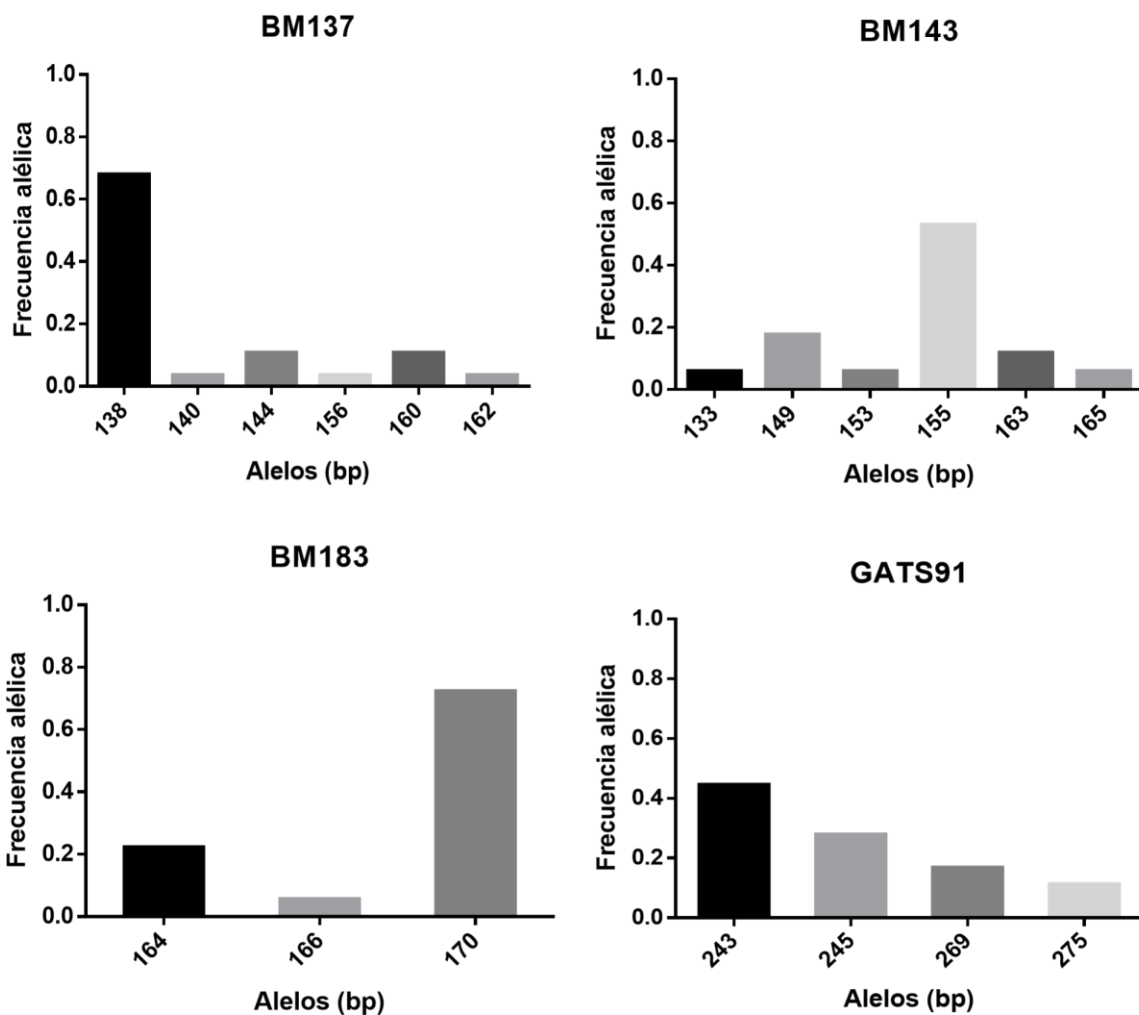
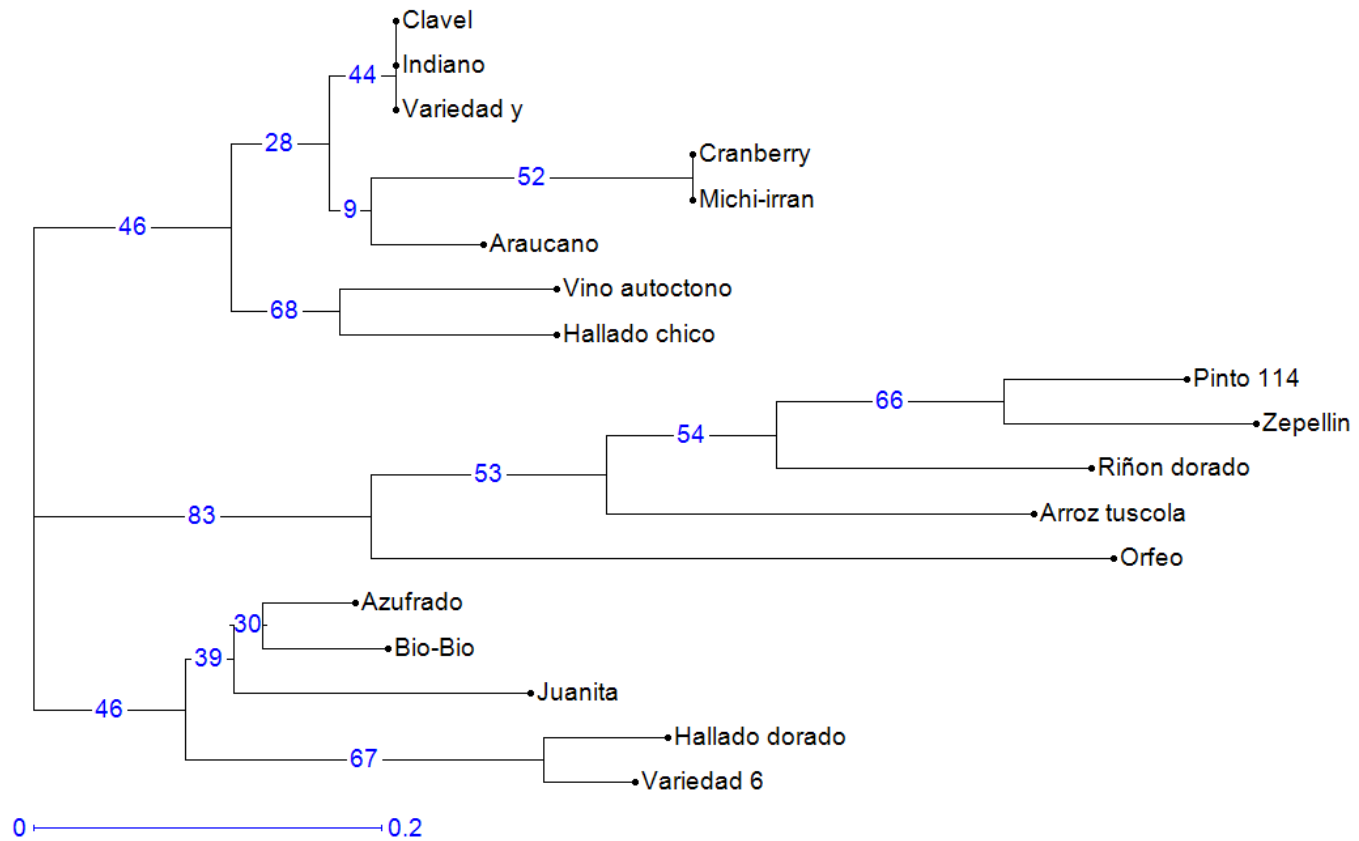


Figura 9: Distribución alélica de los cuatro SSRs analizados (BM137, BM143, GATS91 y BM183) entre las 18 variedades locales chilenas de *P. vulgaris*. En el eje X se muestran los alelos según su tamaño en pb, y en el eje Y su frecuencia dentro de la población de *P. vulgaris* trabajada.



**Figura 10. Dendrograma de la diversidad génica de las variedades locales chilenas de *P. vulgaris*, mediante el uso de cuatro SSRs. Este dendrograma fue hecho con el método de agrupamiento *Neighbor Joining* con el software DARWin v.6.0.21. Los números de los nodos corresponden al análisis de *bootstrap*.**

## 2. Cuantificación de niveles de RFO de variedades locales de *P. vulgaris*

Con el objetivo de determinar el contenido de RFOs de cada una de las variedades disponibles, se redujo los granos de poroto a harina, y se llevó a cabo un protocolo de extracción sólido líquido. Los niveles de glucosa, sacarosa y RFOs fueron posteriormente medidos mediante un método de cuantificación colorimétrico, utilizando un espectrofotómetro y midiendo la longitud de onda a 510 nm.

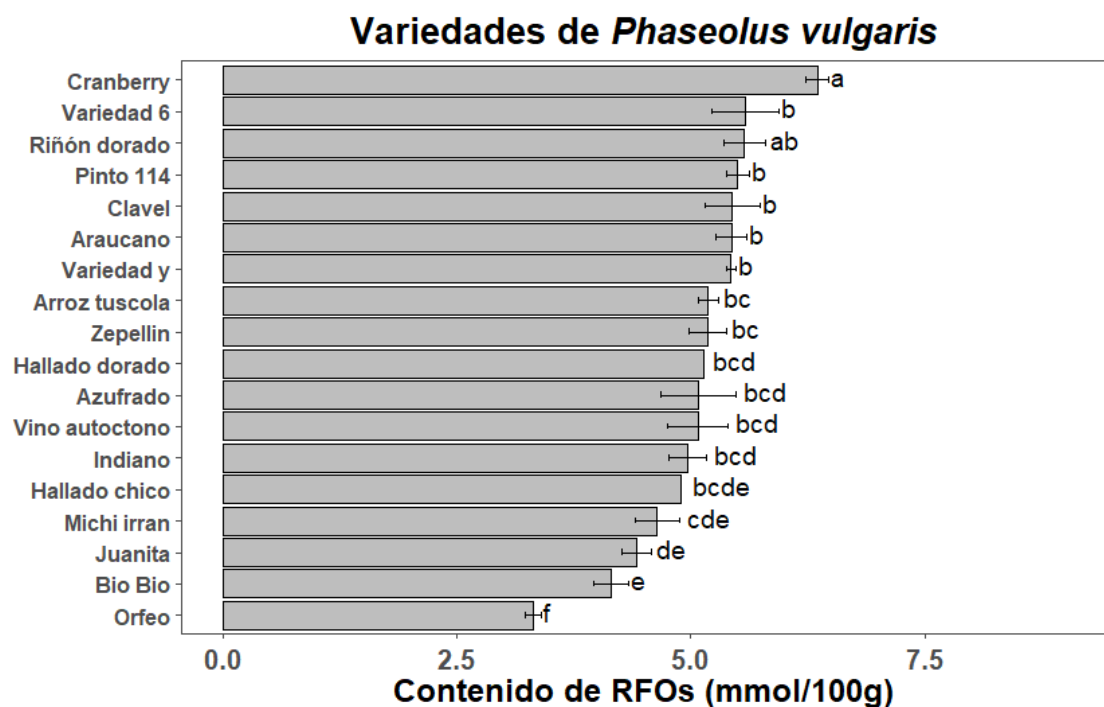
El contenido de RFOs de las variedades locales analizadas se encuentra entre un máximo de 6,353 y un mínimo de 3,310 [mmol/100 g de harina de poroto], para las variedades Cranberry y Orfeo, respectivamente (**Tabla Suplementaria I**).

Debido al método de cuantificación utilizado, no es posible determinar los niveles de rafinosa, estaquiosa y verbascosa de forma independiente. Los resultados obtenidos dan cuenta de la concentración de RFOs como grupo, pues se miden en función de los moles de glucosa liberados después de la acción de la  $\alpha$ -galactosidasa y la invertasa, y en lo que difieren los RFOs no es en sus unidades de glucosa (todos tienen solamente una), sino en las de galactosa. Por esta razón, no se pudo determinar cuál es el oligosacárido predominante en las variedades analizadas, aunque en estudios previos se ha reportado, mediante HPLC, que el oligosacárido predominante en *P. vulgaris* es la estaquiosa (Kuo y col., 1988; McPhee & Myers, 1995). La estaquiosa reportada en estos estudios fue de un promedio de 4,51 mmol/100g de harina en el trabajo de Kuo y col. (1988); mientras que en el estudio de McPhee y Myers (1995) se obtuvo un valor promedio de 3,17 mol/100g de harina. En ambos trabajos se determinó el contenido de cada uno de los oligosacáridos de forma independiente (estaquiosa y rafinosa, pues no se halló más que trazas de verbascosa en las muestras de *P. vulgaris*), algo que no pudo realizarse en este estudio, sin embargo, la suma de los valores de estaquiosa y rafinosa hallados en



estos trabajos no es lejana a los valores de RFOs obtenidos como grupo en el presente seminario de título.

En promedio, se obtuvo un valor de  $5,087 \pm 0,64$  mmol/100g de harina de poroto para la población trabajada. La mayoría de las muestras analizadas se encuentran dentro del error estándar de la media, con las únicas excepciones de Cranberry, Juanita, Bio-Bio y Orfeo.



**Figura 11. Contenido de RFOs de 18 variedades locales de granos de la especie *P. vulgaris*.** Las variedades se encuentran ordenadas de forma decreciente según su contenido de oligosacáridos. Cada barra representa el valor promedio de RFOs por variedad (detallados en la **Tabla Suplementaria I**), junto a su error estándar. Cada ensayo fue realizado en triplicado. Letras en común muestran la ausencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el contenido promedio de RFOs de cada variedad, según lo obtenido a partir de una prueba de ANOVA de un factor y posterior prueba HSD de Tukey para las comparaciones múltiples.

Las letras que más se repiten son la “b” y la “c”, constituyendo en conjunto a aproximadamente un 78% de la colección analizada (14 de 18 muestras), abarcando desde Variedad 6 hasta Michi irran. Todas las variedades a las que se les asignó estas letras se encuentran dentro del intervalo de la desviación estándar.

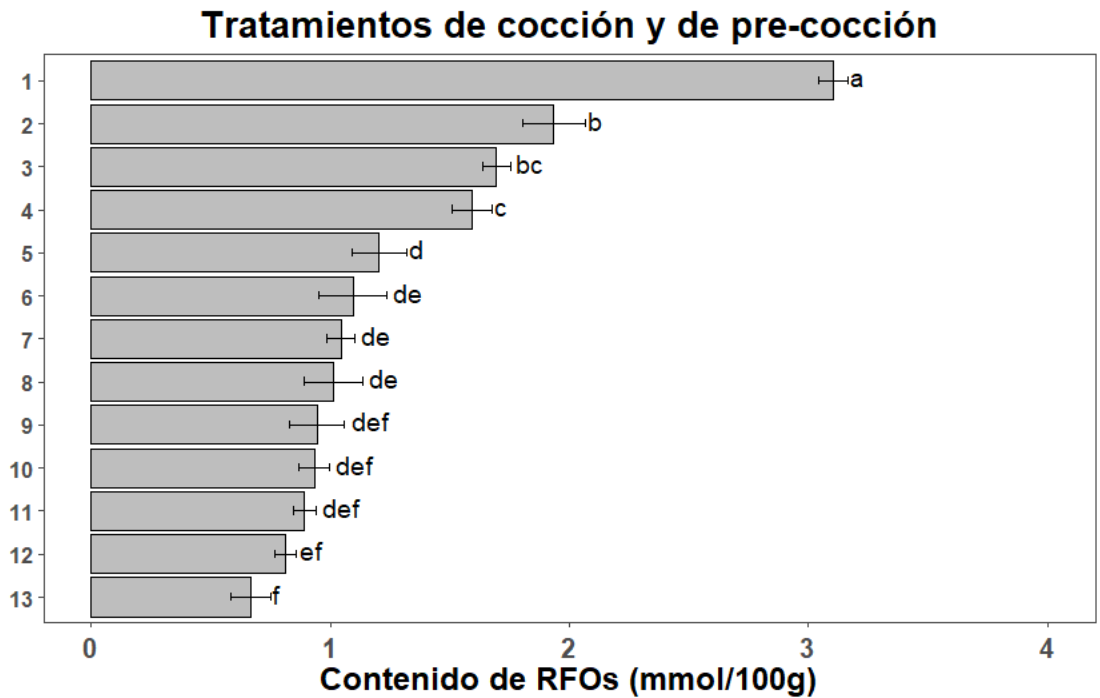
Solo la variedad Orfeo logra diferenciarse totalmente del resto de variedades, siendo la única a la cual se le asignó la letra “f”. Por otro lado, si bien Bio Bio y Juanita tienen letras en común con otras variedades (“e” y “d”), estas constituyen menos de la mitad de la población trabajada, por separado y en conjunto, a diferencia de lo que ocurre con “b” y “c”. Estas tres variedades constituyen el extremo inferior del gráfico (**Figura 11**). En contraste, por el extremo superior se observa la variedad Cranberry, con el mayor contenido de RFOs de las muestras trabajadas. Cranberry de forma similar a Orfeo, se diferencia casi totalmente del resto de variedades, siendo la única excepción la variedad Riñón dorado.

### → 2.1 Cuantificación de niveles de RFO tras distintos tratamientos pre-cocción y de cocción en *P. vulgaris* variedad hallado (comercial)

Con el propósito de comprobar el efecto y potencialmente la eficacia de distintos tratamientos populares de cocción y pre-cocción en la disminución de los niveles de oligosacáridos de los granos de *P. vulgaris*, se cuantificaron los RFOS de una variedad comercial de *P. vulgaris* (*P. vulgaris* variedad Hallado), después de 13 tratamientos diferentes, utilizando el mismo método de extracción y cuantificación empleado anteriormente en las variedades locales del banco de germoplasma. Los tratamientos realizados se encuentran descritos en la **Tabla IV**, junto a sus respectivos resultados.

**Tabla IV. Contenido de RFOs de la variedad comercial de *P. vulgaris* “Hallado”, después de 13 tratamientos de cocción y pre-cocción.** Los resultados se muestran en orden decreciente según el contenido promedio de oligosacáridos por tratamiento. Cada tratamiento se encuentra descrito dentro de la misma tabla y cuenta con una numeración asociada. (Tratamientos realizados por Natalia Jara).

Número	Tratamiento	RFOs [mmol/100g]
1	Sin tratar	3,107
2	Remojo por 12 horas, en presencia de bicarbonato	1,935
3	Remojo por 12 horas	1,695
4	Remojo por 24 horas	1,594
5	Remojo por 12 horas con cambio de agua, cocido una hora	1,203
6	Remojo por 12 horas con cambio de agua, tostado seis minutos, cocido una hora	1,094
7	Remojo por 24 horas con cambio de agua, cocido una hora	1,045
8	Remojo por 24 horas sin cambio de agua, cocido una hora	1,013
9	Remojo por seis horas sin cambio de agua, cocido una hora	0,943
10	Remojo por seis horas con cambio de agua, cocido una hora	0,932
11	Remojo por seis horas con cambio de agua, tostado tres minutos	0,891
12	Tostado tres minutos, sin remojar	0,810
13	Remojo por 12 horas con cambio de agua, tostado tres minutos, cocido una hora	0,667



**Figura 12. Contenido de RFOs de 13 tratamientos de cocción y de pre-cocción sobre una variedad comercial de *P. vulgaris* (Hallado).** Los tratamientos se encuentran ordenados de forma decreciente según su contenido de oligosacáridos. La numeración presente en el eje y representa a cada uno de los tratamientos realizados, que se encuentran detallados en la **Tabla V**. Cada barra representa el valor promedio de RFOs por tratamiento, junto a su error estándar. Cada ensayo fue realizado en triplicado. Letras en común indican la ausencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el contenido promedio de RFOs de cada tratamiento, según lo obtenido a partir de una prueba de ANOVA de un factor y posterior prueba HSD de Tukey para las comparaciones múltiples.

En cada preparación se pusieron a prueba diferentes variables, siendo estas: remojo, cambio de agua, cocción, tostado y presencia de bicarbonato. Las preparaciones más simples fueron las que consistían únicamente de remojo a diferentes tiempos. Si bien estas prácticas resultaron ser las menos eficaces de todas las evaluadas, aun así, suponen una disminución de aproximadamente el 45% del contenido total de RFOs. El remojo en conjunto con el proceso de cocción, técnicas comúnmente utilizadas en preparaciones de porotos, conforman una buena base para la reducción de RFOs; todas

las preparaciones que constan de ambos factores vieron reducidos sus oligosacáridos entre un 60 y 80%. El tostado de los granos, por su parte, resultó ser factor importante para llevar la reducción de RFOs más allá del que ofrece la cocina tradicional, donde tres de los cuatro métodos más eficientes contienen esta variable, proporcionando una reducción de RFOs que va entre 70 y 80%. Por otro lado, que haya o no cambio de agua durante el remojo no otorgó resultados consistentes, así como tampoco la presencia de bicarbonato en el agua influyó en el efecto del remojo (no se encontraron diferencias significativas entre el remojo de 12 horas con y sin bicarbonato). El tratamiento más eficaz resultó ser el remojo por 12 horas con cambio de agua, tostado tres minutos y cocido por una hora.

### **3. Identificación de genes candidatos de la vía de biosíntesis de RFOs en *P. vulgaris***

Con el objetivo de identificar los genes implicados en la vía biosintética de RFOs, se buscaron las secuencias aminoacídicas de las enzimas de la vía descritas en otras plantas y se hicieron BLASTs bidireccionales en contra del genoma de *P. vulgaris*. Las enzimas de interés corresponden a la inositol-3- $\alpha$ -galactosiltransferasa (GOLS); galactinol-sacarosa galactosiltransferasa (RAFS), y galactinol-rafinosa galactosiltransferasa (STS).

Si bien en plantas como *V. angularis* y *P. sativum* solo se encontró una y dos enzimas de la vía descritas, respectivamente, en las otras plantas usadas, *A. thaliana* y *G. max*, se encontraron varias, las cuales después de realizados los BLASTs en contra del genoma de *P. vulgaris* arrojaron siempre los mismos resultados, los que coincidían entre sí y también con los obtenidos a partir de poroto adzuki (*V. angularis*) y arveja (*P.*

*sativum*), con variaciones en sus porcentajes de identidad, diferencia que se notó especialmente en *A. thaliana*.

Tras comprobar la bidireccionalidad de los resultados, se obtuvieron tres posibles genes para *GolS* en *P. vulgaris*, con los siguientes códigos de acceso: PHAVU\_001G215300g, PHAVU\_001G223700g, y PHAVU\_007G203400g, resultados que se repiten tanto al comparar con el genoma de *A. thaliana*, como con el de *G. max*. Para *RafS* se obtuvieron también tres posibles genes, cuyos códigos de acceso son: PHAVU\_009G175400g, PHAVU\_004G007100g y PHAVU\_008G282600g, a partir del análisis contra el genoma de *A. thaliana* y *P. sativum*. Finalmente, en el caso de *StS* tanto al comparar con enzimas descritas en *A. thaliana*, *G. max*, *P. sativum*, y *V. angularis*, siempre se llegó al mismo gen, código de acceso PHAVU\_001G214300g.

**Tabla V: Putativos genes candidatos de la vía de biosíntesis de RFOs en *P. vulgaris*, identificados mediante BLASTs bidireccionales.** En blanco se presenta la información de la enzima, el organismo modelo utilizado y el locus del gen, mientras que en gris se muestran los resultados obtenidos de los BLASTs en ambas direcciones.

Enzima			Modelo			<i>P. vulgaris</i>	tBLASTn		tBLASTx	
Nombre aceptado	Alias	EC	Organismo	Locus	Referencia	Mejores hits	e-value	% identidad	e-value	% identidad
Inositol 3- $\alpha$ -galactosil-transferasa	GOLS	2.4.1.123	<i>A. thaliana</i> <sup>1</sup>	AT2G47180	Panikulangara y cols., 2004	PHAVU_001G215300g	0.0	79.75%	6,00E <sup>-170</sup>	90.73%
						PHAVU_001G223700g	0.0	75.70%	6,00E <sup>-170</sup>	76.67%
						PHAVU_007G203400g	0.0	73.90%	3,00E <sup>-160</sup>	75.96%
			<i>G. max</i>	GLYMA_19g227800	Van Ha y cols., 2015	PHAVU_001G223700g	0.0	90.60%	0.0	87.46%
						PHAVU_007G203400g	0.0	82.48%	0.0	87.06%
						PHAVU_001G215300g	1,00E <sup>-176</sup>	78.07%	4,00E <sup>-169</sup>	83.33%
Galactinol-sacarosa galactosil-transferasa	RAFS	2.4.1.82	<i>A. thaliana</i>	AT5G40390	Anderson & Kohorn, 2001	PHAVU_009G175400g	0.0	63.43%	0.0	69.49%
						PHAVU_004G007100g	0.0	63.14%	0.0	74.21%
			<i>A. thaliana</i>	AT1G55740	Lamesch y cols., 2012	PHAVU_008G282600g	0.0	69.84%	0.0	73.67%
						<i>P. sativum</i>	AJ426475	Peterbauer y cols., 2002a	PHAVU_009G175400g	0.0
PHAVU_004G007100g	0.0	64.15%	0.0	72.67%						
Galactinol-rafinosa galactosil-transferasa	STS	2.4.1.67	<i>A. thaliana</i>	AT4G01970	Gangl & Tenhaken, 2016	PHAVU_001G214300g	0.0	57.24%*	0.0	72.96%
						<i>G. max</i>	GLYMA_19G217700	Schmutz y cols., 2010	PHAVU_001G214300g	0.0
			<i>P. sativum</i>	AJ512932	Peterbauer y cols., 2002b				PHAVU_001G214300g	0.0
						<i>V. angularis</i>	LR48_Vigan03g277100	Peterbauer & Richter, 1998	PHAVU_001G214300g	0.0

<sup>1</sup>En el genoma de *Arabidopsis* se encontró ocho genes codificando por Gols, pero en vista de que todos ellos arrojaban los mismos tres resultados en *P. vulgaris* (PHAVU\_001G215300g, PHAVU\_001G223700g, PHAVU\_007G203400g), se optó por mostrar únicamente los resultados de uno de los genes. Para evitar redundancias, se optó por hacer lo mismo con las secuencias de *G. max* en caso de obtenerse resultados repetidos.

## DISCUSIÓN

Tomando en cuenta el creciente interés que ha atraído esta legumbre en el último tiempo debido a su importancia alimentaria y medioambiental, evaluar la diversidad genética de una población de variedades chilenas de *P. vulgaris*, distintas a las que ya se encuentran dentro del mercado internacional, para posteriormente asociar el análisis molecular con información fenotípica constituye un primer acercamiento importante en el ámbito de mejoramiento de cultivos.

### **1. Caracterización molecular de la diversidad genética de variedades locales de *P. vulgaris***

Los tamaños de los alelos obtenidos en este trabajo, para los SSRs BM137, BM143, BM183 y GATS91, se encuentran en un rango que coincide con los presentados en estudios anteriores (Blair y col., 2006). El uso de estos cuatro SSRs permitió diferenciar 13 de las 18 variedades de *P. vulgaris* trabajadas; aquellas que no se pudo distinguir entre sí fueron, por un lado, Variedad y, Clavel e Indiano, y por el otro Cranberry y Michirran (**Tabla II; Figura 8**).

Con respecto a los marcadores que no amplificaron en ninguna variedad, PV-AT001, PV-AT007, BM152, BM160 y BM172, todos marcados con FAM, cualquier tipo de problema ligado a la inyección de la muestra, como la presencia de burbujas en el tubo, volumen de muestra insuficiente o una mala calibración del equipo (Orbison, 2013), fueron descartados debido a que estas muestras fueron enviadas en conjunto con aquellas marcadas con PET, y estas últimas si fueron capaces de generar un peak de fluorescencia detectable por el equipo. Sumado a ello, también se descarta la posibilidad



de que estos marcadores simplemente no se encuentren presentes en las variedades estudiadas, ya que durante pruebas previas en las que solo se utilizó el par de partidores sin modificar, y que fueron visualizadas en geles de agarosa bajo luz UV, estos SSRs si amplificaban (**Figuras S2 y S3**). Debido a esto, se cree que el problema estaría directamente ligado a la pérdida de fluorescencia de FAM, razón por la que el equipo no fue capaz de detectar ninguna señal.

Originalmente se considera que un marcador es polimórfico si tiene como mínimo dos alelos, y el menos frecuente de ellos tiene por lo menos una frecuencia del 1% (Shete y col., 1999; Ford, 1940). Bajo esta definición, todos los SSRs utilizados en este trabajo resultaron ser polimórficos; sin embargo, al evaluarlos según su contenido de información polimórfica (PIC) se obtuvo que BM143 y GATS91 son altamente informativos ( $PIC > 0,5$ ), mientras que BM137 y BM183 son solo relativamente informativos ( $0,5 > PIC > 0,25$ ) (Botstein y col., 1980), siendo este último el menos eficaz de los 4, ya que con el uso aislado de BM183 solo se podría diferenciar a la variedad Orfeo, y de todos modos al usarse en conjunto con los demás marcadores no aporta ningún tipo de información.

Por otro lado, se tiene la heterocigosidad esperada de Nei o diversidad génica, que se define como la probabilidad de que al tomar un individuo aleatorio de una población bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg, este sea heterocigoto (Nei, 1973). Esta depende del número de alelos y de la distribución de estos (equitatividad; relacionada a la frecuencia alélica) (Grünwald y col., 2003), y se considera que mientras más cercana sea a 1, más diversa será la población. En la **Tabla III** se puede observar que la población analizada tiende a la homocigosis en tres de los cuatro SSRs utilizados, el único SSR en el que se encontraron heterocigotos siendo BM137, y que de todos modos tiene un alelo sobre-

representado en la población (138 pb). En todos los casos se obtuvo que la heterocigosidad observada es menor que la esperada, lo que se condice con los valores del índice de Wright, que da cuenta del exceso (cuando es cercano a 0) o deficiencia de heterocigotos (cercano a 1) (Wright, 1978). Esto tiene sentido tomando en cuenta que *P. vulgaris* es una especie con un sistema reproductivo donde predomina la autopolinización (Gepts, 2001), y que además las muestras trabajadas provienen de un banco de germoplasma, donde ha habido intervención antropogénica para conservarlas durante generaciones.

Adicionalmente, en el contexto de microsatélites, un alelo nulo es cualquier alelo que se encuentre presente en un locus pero que no logra amplificar a niveles detectables durante la reacción de PCR (Dakin & Avise, 2004). En este estudio, asumiendo la presencia de alelos nulos según lo arrojado por Micro-checker (pues el *software* no da una certeza, más bien sugiere su presencia en base al exceso de homocigosis), la frecuencia promedio de estos calculada por ML-Null Freq sería cercana a un 40%, un valor bastante alto, lo que supone un problema ya que pueden causar clasificaciones erróneas de heterocigotos como homocigotos, afectar los valores de frecuencia alélica y diversidad, provocar errores de asociación, etc., cosas que hacen que el estudio pierda poder (Carlson y col., 2006). Estos pueden generarse por mal *annealing* de los partidores a causa de mutaciones en las secuencias que flanquean el SSR, por mala calidad o bajo contenido de DNA templado, así como también por amplificación diferencial según el tamaño de los alelos (alelos más pequeños amplifican más eficientemente) (Dakin & Avise, 2004). Sin embargo, también ocurre que el exceso de homocigosis causado por fenómenos biológicos como la endogamia es confundido con la presencia de alelos nulos (Chakraborty y col., 1992), lo cual en este estudio en particular es bastante probable, por

razones que ya fueron mencionadas más arriba, por lo tanto, se decidió continuar con los análisis con todos los marcadores que amplificaron. Para determinar con certeza la presencia de alelos nulos, una opción sería hacer cruces entre variedades y determinar si el genotipo de la descendencia es coherente con el de los parentales; de igual modo se pueden secuenciar los productos de PCR y evaluar el estado de las secuencias que flanquean los SSRs, diseñando nuevos partidores en caso de ser necesario; o incluso, revisar bibliotecas genómicas (en caso de disponer de ellas) y comparar las secuencias que flanquean los loci de interés, pero eso es algo que se escapa de este estudio en particular.

## **2. Cuantificación de niveles de RFO de variedades locales de *P. vulgaris***

Con respecto al análisis del contenido de azúcares, si bien los niveles de RFOs en las variedades locales trabajadas van desde 3,31 hasta 6,35 mmol/100g de harina, donde Orfeo posee aproximadamente la mitad de contenido de oligosacáridos que la variedad Cranberry, en realidad la mayoría de las muestras se encuentran dentro del intervalo de la desviación estándar ( $5,109 \pm 0,67$  mm/100g). A partir de esto se consideró que los resultados más relevantes de esta parte del trabajo fueron derivados de las variedades locales: Cranberry, Juanita, Bio-bio y Orfeo, pues todas las demás variedades con las que se trabajó no presentan diferencias significativas en los niveles de RFO con la mayoría del resto de muestras.

Anteriormente se ha reportado que de entre seis variedades chilenas estudiadas (Orfeo, Arroz Tuscola, Barbucho, Coscorrón, Tórtola y Pinto), Orfeo es la que menos afectada se ve ante situaciones de estrés por sequía (Martínez y col., 2007). El rol de los RFOs dentro de la planta se ha asociado a la tolerancia a estrés abiótico como el frío y sequía (Elsayed y col., 2014), actuando como osmoprotectores. Con esto en consideración, se

podría pensar que la tolerancia al estrés hídrico de la variedad Orfeo podría deberse a que acumula más RFOs que el resto, pero esto no coincide con lo reportado en el presente seminario de título. Se ha reportado que la función osmoprotectora de los RFOs no es exclusiva de ellos, sino que también está dada por otras moléculas como los ciclitoles y otros azúcares alcoholes que contribuyen a la tolerancia a estrés abiótico (Streeter y col., 2001; Ahmad y col., 2020). Orfeo al ser la variedad con menor contenido de RFOs de las estudiadas, pero también la que cuenta con la mayor tolerancia al estrés hídrico, podría estar acumulando otro tipo de osmolitos, o contar con otro mecanismo de respuesta que le permita prescindir de la alta acumulación de RFOs, pero esto es algo que aún queda abierto a posterior estudio.

### **→ 2.1 Cuantificación de niveles de RFO tras distintos tratamientos pre-cocción y de cocción en el *P. vulgaris* variedad hallado (comercial)**

A partir de los resultados obtenidos de las muestras cocinadas, en primer lugar, se observa que el poroto hallado común, que se comercializa con normalidad, sin ningún tipo de tratamiento ya cuenta con un menor nivel de RFOs (3,2 mmol/100g) que todas las variedades chilenas evaluadas en el experimento anterior, siendo incluso ligeramente menor a la variedad Orfeo. Sumado a ello, únicamente con un remojo de 12 horas su contenido de RFO se reduce casi a la mitad. Al extenderlo a 24 horas no se encontraron diferencias significativas, lo que coincide con estudios previos donde se ha reportado que la disminución más notable del contenido de RFOs se da en las primeras horas de remojo (Somari & Balogh, 1993), por difusión simple desde el grano al agua del medio (Barampama & Simard, 1994) y mediante degradación enzimática por acción de  $\alpha$ -galactosidasas (Vidal-Valverde y col., 1993). En general, mientras más tiempo pasen remojando mayor será la remoción de RFOs, pero el tiempo necesario para obtener un

cambio significativo después de las primeras horas de remojo varía de legumbre en legumbre (Thirunathan & Manickavasagan, 2019), y según los resultados obtenidos en este trabajo, 12 horas extra no son suficientes para lograr cambios notables en *P. vulgaris*, y extender el remojo por más de 24 horas resulta poco conveniente. Con respecto a la cocción, se ha reportado que el calor favorece la hidrólisis térmica de los RFOs, lo que explica que en conjunto con el remojo constituyan un método sólido para la disminución de estos oligosacáridos.

Finalmente, en el caso del tostado, que resultó ser de los tratamientos más influyentes en la reducción del contenido de RFOs en este trabajo, no se tienen reportes previos de su efecto sobre estos oligosacáridos en legumbres, pero lo que más se acerca es el efecto del tostado en la degradación de polisacáridos en granos de café (Redgwell y col., 2002).

### **3. Identificación de genes candidatos de la vía de biosíntesis de RFOs en *P. vulgaris***

Después de buscar las secuencias aminoacídicas de las enzimas de la vía de biosíntesis de RFOs en organismos en los que estuviesen descritas (*A. thaliana*, *G. max*, *P. sativum* y *V. angularis*), se realizaron BLASTs bidireccionales en contra del genoma de *P. vulgaris*. A partir de este análisis se encontró un total de siete posibles genes candidatos que cumplían con el criterio de bidireccionalidad establecido (un porcentaje de identidad superior al 60% y un e-value menor a  $10^{-20}$ ) que entrega evidencia que son posibles ortólogos (Pearson, 2013), de los cuales tres codifican para *GoIS*, tres para *RafS* y uno para *StS*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los reportados recientemente por de Koning y col. (2021), con la excepción de PHAVU\_008G282600g,

resultado que únicamente se obtuvo dentro del marco de este seminario de título. PHAVU\_008G282600g corresponde al código de acceso de un gen de una putativa Rafinosa Sintasa, *hit* que fue obtenido a partir del BLAST realizado en contra de *A. thaliana*. Para determinar con mayor precisión si efectivamente este resultado corresponde al gen de interés de este trabajo, podrían realizarse estudios en los que se evalúe si los dominios catalíticos se encuentran conservados.

Hubo únicamente un resultado de BLAST que no cumplió con los parámetros mínimos pero que fue incluido de todos modos dentro de los resultados, correspondiente al mejor hit de tBLASTn de *StS* de *A. thaliana* contra el genoma de *P. vulgaris*. Se tomó esta decisión pues aunque cuenta con un menor porcentaje de identidad (57%), el resultado fue el mismo que se obtuvo con los otros 3 modelos, por lo que sirve para dar cuenta en cómo afecta la distancia genética en el alineamiento de secuencias, puesto que si bien todos los organismos utilizados en este análisis pertenecen al mismo clado (Eudicotyledoneae), *A. thaliana* se encuentra a dos categorías taxonómicas de distancia de todas las demás, formando parte del orden de las Brassicales, familia Brassicaceae, mientras que *P. sativum*, *G. max*, *V. angularis* y *P. vulgaris* son del orden de las Fabales, familia Fabaceae.

Tomando en cuenta el enfoque internacional de sustituir las proteínas de origen animal por las de origen vegetal, para así alcanzar la llamada “dieta sustentable”, es importante darle una vista más atractiva al consumo de legumbres. La reducción de compuestos de efectos indeseables como los oligosacáridos de la familia rafinosa parece ser una buena manera de abordar esta problemática, tomando en cuenta que es uno de los factores que vuelve menos apetecibles a estos alimentos, sin embargo, primero se deben considerar todas las aristas para realizar una propuesta viable.

Como se mencionó con anterioridad, los RFOs en la planta actúan como osmoprotectores, contribuyendo a la tolerancia al frío y sequía junto a otras moléculas como los ciclitoles, donde se ha propuesto forman un microambiente de agua y grupos OH para proteger a las proteínas de membrana de la denaturación (Castillo y col., 1990). Sin embargo, se ha demostrado que su rol no es crítico, puesto que ya sea generando mutantes de *A. thaliana* que sobreexpresan las enzimas de la vía (Iftime y col., 2011), u otros que tengan genes interrumpidos (Knaupp y col., 2011), no se observan mayores cambios en la planta más allá de la propia acumulación de los compuestos de la vía. No obstante, este no es el único papel que cumplen dentro de la planta, pues también se ha reportado que tienen un rol de reserva y fuente de energía durante la etapa de germinación temprana, donde al inhibir las enzimas que degradan estos compuestos, la tasa de germinación se vio disminuida en un 70% (Blöchl y col., 2007). Esto último es algo que complica el panorama puesto que, al verse afectada la tasa de germinación, se retrasarían también los tiempos de cosecha, y tomando en cuenta que una de las ventajas de las legumbres es enriquecer los suelos al ser integradas en sistemas de rotación de cultivos (Cerquiglino y col., 2016), no solo se verían afectados los cultivos de legumbres sino también los que le siguen.

Teniendo esto en consideración, una forma más conveniente de abordar el problema sería enfocándose en tratamientos post-cosecha, donde gran parte de ellos ya se encuentran adheridos al conocimiento popular, como lo son el remojo y por supuesto, la cocción, aunque ambos a pesar de ser simples y efectivos, consumen bastante tiempo, y no pueden ser aplicados de forma industrial sin comprometer el aspecto no perecedero de las legumbres. El tostado por otra parte sería una buena y novedosa alternativa en lo que al procesamiento de porotos se refiere, como se hace con los granos de café, o

también recurriendo a la producción de harinas tostadas de poroto que actúen como un complemento de la dieta.



## CONCLUSIONES

- 1) Mediante el uso de cuatro SSRs se logró diferenciar 13 de 18 variedades locales de *P. vulgaris* analizadas. Dos de ellos fueron altamente informativos (BM143, GATS91) y dos medianamente informativos (BM137, BM183).
- 2) A partir de los cuatro SSRs utilizados, se determinó que la población de *P. vulgaris* analizada es poco diversa, con una heterocigosidad observada promedio de 0,1.
- 3) En promedio, las 18 variedades analizadas tienen un contenido de 5,1 mmoles de RFOs/100g de harina. La variedad local con menor contenido de RFOs fue la variedad Orfeo, con un valor de 3,3 mmoles de RFOs/100g de harina, mientras que Cranberry corresponde al valor máximo de 6,4 mmoles de RFOs/100g de harina.
- 4) Si bien la variación de contenido de RFOs entre variedades locales es significativa, el valor mínimo encontrado es superior al que posee la variedad comercial de *P. vulgaris* "Hallado".
- 5) Los tratamientos más eficaces para reducir los niveles de RFOs en *P. vulgaris* comercial fueron aquellos que implican un aumento de temperatura (cocción o tostado).
- 6) Se encontraron tres posibles genes que codifican para GOLS en el genoma de *P. vulgaris*, cuyos códigos de acceso son: *PHAVU\_001G215300g*, *PHAVU\_001G223700g*, y *PHAVU\_007G203400g*.
- 7) Se encontraron tres posibles genes que codifican para RAFS en el genoma de *P. vulgaris*, cuyos códigos de acceso son: *PHAVU\_009G175400g*, *PHAVU\_004G007100g*, y *PHAVU\_008G282600g*.
- 8) Se encontró un posible gen que codifica para STS en el genoma de *P. vulgaris*, cuyo código de acceso es: *PHAVU\_001G214300g*.

## PROYECCIONES

Se pudo distinguir la mayoría de las variedades trabajadas mediante el uso de 4 SSRs, sin embargo, contar con una mayor amplitud de marcadores moleculares sería ideal a futuro, especialmente si se está trabajando con grandes cantidades de muestras (considerando que en Chile hay más de 200 variedades de *P. vulgaris*).

Las variedades Cranberry, Juanita, Bio-Bio y Orfeo, al ser las que tienen el contenido de RFOs más alejado del resto, podrían ser sometidas a estudios para determinar el efecto de distintas variables sobre los niveles de RFOs. Ensayos de estrés hídrico, estrés por temperatura, estudios de germinación, así como también el efecto de los tratamientos de cocción y pre-cocción en estos granos de interés, posterior al tiempo de cosecha. A partir de estos estudios, en conjunto con la información que se tiene sobre los genes de la vía, se podría aspirar a producir un suplemento alimenticio hecho a base de *P. vulgaris* que contenga un menor contenido de RFOs sin afectar el alto contenido nutritivo de esta legumbre.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, F., Singh, A., & Kamal, A. 2020. Osmoprotective Role of Sugar in Mitigating Abiotic Stress in Plants. *Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress*. **1**:53–70.
- Alexander, P., Brown, C., Arneith, A., Finnigan, J., & Rounsevell, M. D. A. 2016. Human appropriation of land for food: The role of diet. *Global Environmental Change*. **41**: 88–98.
- Barampama, Z., & Simard, R. E. (1994). Oligosaccharides, Antinutritional Factors, and Protein Digestibility of Dry Beans as Affected by Processing. *Journal of Food Science*. **59**:833–838.
- Bitocchi, E., Nanni, L., Bellucci, E., Rossi, M., Giardini, A., Zeuli, P. S., Logozzo, G., Stougaard, J., McClean, P., Attene, G., & Papa, R. 2012. Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**:788–796.
- Blair, M., Giraldo, M., Buendía, H., Tovar, E., Duque, M., & Beebe, S. 2006. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. **113**:100-109.
- Blair, M., Pedraza, F., Buendia, H., Gaitán-Solís, E., Beebe, S., Gepts, P., & Tohme, J. 2003. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. **107**:1362-1374.
- Blöchl, A., Peterbauer, T., & Richter, A. 2007. Inhibition of raffinose oligosaccharide breakdown delays germination of pea seeds. *Journal of Plant Physiology*. **164**:1093–1096.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. 1980. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am J Hum Gen*. **32**:314–331.
- Calles, T., Xipsiti, M., & del Castillo, R. 2019. Legacy of the International Year of Pulses. *Environmental Earth Sciences*. **78**:1–8.
- Carlson, C. S., Smith, J. D., Stanaway, I. B., Rieder, M. J., & Nickerson, D. A. 2006. Direct detection of null alleles in SNP genotyping data. *Human Molecular Genetics*. **15**:1931–1937.
- Castillo, E. M., de Lumen, B. O., Reyes, P. S., & de Lumen, H. Z. 1990. Raffinose Synthase and Galactinol Synthase in Developing Seeds and Leaves of Legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **38**:351–355.

Cerquiglioni, C., Claro, J., Giusti, A. M., Karumathy, G., Mancini, D., Marocco, E., Mascianá, P., Michetti, M., & Milo, M. 2016. Food Outlook June 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Chacón S, M. I., Pickersgill, B., & Debouck, D. G. 2005. Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. *Theoretical and Applied Genetics*, **110**: 432–444.

Chakraborty, R., De Andrade, M., Daiger, S.P., Budowle, B. 1992. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Ann Hum Genet.* **56**:45–57.

Cheng, C. Y., Krishnakumar, V., Chan, A. P., Thibaud-Nissen, F., Schobel, S., & Town, C. D. 2017. Araport11: a complete reannotation of the *Arabidopsis thaliana* reference genome. *Plant Journal*, **89**: 789–804.

Dakin, E. E., & Avise, J. C. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*. **93**:504–509.

Elsayed, A. I., Rafudeen, M. S., & Gollack, D. 2014. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: Protection against abiotic stress. *Plant Biology*. **16**:1–8.

FAO. 1996. Rome Declaration on World Food Security and World Food Summit Plan of Action: World Food Summit. 13-17.

Feregrino-Pérez, A. A., Berumen, L. C., García-Alcocer, G., Guevara-Gonzalez, R. G., Ramos-Gomez, M., Reynoso-Camacho, R., Acosta-Gallegos, J. A., & Loarca-Piña, G. 2008. Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on azoxymethane-induced colon cancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**:8737–8744.

Ford, E.B. 1940. Polymorphism and taxonomy. En J. Huxley, *The New Systematics*. pp. 493–513. Clarendon Press, Oxford.

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**:2128-2136.

Gangl, R., & Tenhaken, R. 2016. Raffinose family oligosaccharides act as galactose stores in seeds and are required for rapid germination of *Arabidopsis* in the dark. *Frontiers in Plant Science*, **7**: 1–15.

Gepts, P. 2001. *Phaseolus vulgaris* (Beans). *Encyclopedia of Genetics*. 1444–1445.

Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A. & Tempio, G. 2013. Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities. pp 15-21. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.

Grünwald, N. J., Goodwin, S. B., Milgroom, M. G., & Fry, W. E. 2003. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology*. **93**:738–746.

Howe KL, Contreras-Moreira B, De Silva N, Maslen G, Akanni W, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Barba M, Bolser DM, Cambell L, Carbajo M, Chakiachvili M, Christensen M, Cummins C, Cuzick A, Davis P, Fexova S, Gall A, George N, Gil L, Gupta P, Hammond-Kosack KE, Haskell E, Hunt SE, Jaiswal P, Janacek SH, Kersey PJ, Langridge N, Maheswari U, Maurel T, McDowall MD, Moore B, Muffato M, Naamati G, Naithani S, Olson A, Papatheodorou I, Patricio M, Paulini M, Pedro H, Perry E, Preece J, Rosello M, Russell M, Sitnik V, Staines DM, Stein J, Tello-Ruiz MK, Trevanion SJ, Urban M, Wei S, Ware D, Williams G, Yates AD, Flicek P. 2019. Ensembl Genomes 2020-enabling non-vertebrate genomic research. *Nucleic Acids Research*. **48**:689-695.

Iftime, D., Hannah, M. A., Peterbauer, T., & Heyer, A. G. 2011. Stachyose in the cytosol does not influence freezing tolerance of transgenic Arabidopsis expressing stachyose synthase from adzuki bean. *Plant Science*. **180**:24–30.

Jorge, T. F., Florêncio, M. H., Ribeiro-Barros, A. I., & Antônio, C. 2017. Quantification and structural characterization of raffinose family oligosaccharides in *Casuarina glauca* plant tissues by porous graphitic carbon electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*. **413**:127–134.

Knaupp, M., Mishra, K. B., Nedbal, L., & Heyer, A. G. 2011. Evidence for a role of raffinose in stabilizing photosystem II during freeze-thaw cycles. *Planta*. **234**:477–486.

de Koning, R., Kiekens, R., Toili, M. E. M., & Angenon, G. 2021. Identification and expression analysis of the genes involved in the raffinose family oligosaccharides pathway of *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max*. *Plants*, **10**: 1-21.

Kuo, T. M., VanMiddlesworth, J. F., & Wolf, W. J. 1988. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **36**:32–36.

Lamesch, P., Berardini, T. Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Muller, R., Dreher, K., Alexander, D. L., Garcia-Hernandez, M., Karthikeyan, A. S., Lee, C. H., Nelson, W. D., Ploetz, L., Singh, S., Wensel, A., & Huala, E. 2012. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): Improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Research*, **40**: 1202–1210.

Li, S., Li, T., Kim, W. D., Kitaoka, M., Yoshida, S., Nakajima, M., & Kobayashi, H. 2007. Characterization of raffinose synthase from rice (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare). *Biotechnology Letters*. **29**:635–640.

Liu, J. J., Odegard, W., & De Lumen, B. O. 1995. Galactinol synthase from kidney bean cotyledon and zucchini leaf: Purification and N-terminal sequences. *Plant Physiology*. **109**:505–511.

Manzur, M. I. 2016. Catálogo de semillas tradicionales de Chile. Fundación Sociedades Sustentables (Chile sustentable). pp 135-165; 168-189; 198-215. Chile.

Martínez, J. P., Silva, H., Ledent, J. F., & Pinto, M. 2007. Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Journal of Agronomy*. **26**:30–38.

McPhee, K. E. & Myers, J. R. 1995. *Screening Common Bean Germplasm for Raffinose-Family Oligosaccharide Content*. 255–257.

Mekonnen, M.M. and Hoekstra, A.Y. 2010. The green, blue and grey water footprint of farm animals and animal products, Value of Water Research Report Series No. 48, UNESCO-IHE, Delft, the Netherlands.

Naczk, M., Amarowicz, R., & Shahidi, F. 1997.  $\alpha$ -Galactosides of Sucrose in Foods: Composition, Flatulence-Causing Effects, and Removal. ACS Symposium Series. **662**:127–151.

Nei, M. 1973. F-statistics and gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Gent.* **41**:225–233.

Oblessuc, P. R., de Campos, T., Cardoso, J. M. K., Sforça, D. A., Baroni, R. M., de Souza, A. P., & Benchimol, L. L. 2009. Adaptation of fluorescent technique for genotyping with new microsatellite markers in common bean. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. **44**:638–644.

ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias). Base de datos de comercio exterior, Santiago, Chile: ODEPA, 2021. Recuperado de: <https://www.odepa.gob.cl/estadisticas-del-sector/bases-de-datos-comercio-exterior.xls>

ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias). Evolución de la superficie frutícola por región, Santiago, Chile: ODEPA, 2021. Recuperado de: <https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2021/11/SuperficieFruticolaRegion202111.xls>

ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias). Información nacional de superficie sembrada, producción y rendimientos anuales, Santiago, Chile: ODEPA, 2021.

Recuperado de: <https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2021/08/CultivosAnualesHistorico082021.xls>

Orbison, A. 2013. *Troubleshooting – Common Amplification and CE Errors/Issues*.

Panikulangara, T. J., Eggers-Schumacher, G., Wunderlich, M., Stransky, H., & Schöffl, F. 2004. Galactinol synthase1. A novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in Arabidopsis. *Plant physiology*, **136**:3148–3158.

Pearson, W. R. 2013. An introduction to sequence similarity (“homology”) searching. *Current Protocols in Bioinformatics, SUPPL.* **42**:1–8.

Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J.P. 2006. DARwin software. <http://darwin.cirad.fr/>

Peterbauer, T., & Richter, A. 1998. Galactosylononitol and stachyose synthesis in seeds of adzuki bean. Purification and characterization of stachyose synthase. *Plant Physiol*, **117**:165-72.

Peterbauer, T., & Richter, A. 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research*. **11**:185–197.

Peterbauer, T., Mucha, J., Mach, L., Richter, A. 2002. Chain Elongation of raffinose in pea seeds. Isolation, characterization, and molecular cloning of multifunctional enzyme catalyzing the synthesis of stachyose and verbascose. *J Biol Chem*, **277**:194-200.

Peterbauer, T., Mach, L., Mucha, J., Richter, A. 2002. Functional expression of a cDNA encoding pea (*Pisum sativum* L.) raffinose synthase, partial purification of the enzyme from maturing seeds, and steady-state kinetic analysis of raffinose synthesis. *Planta*, **215**:839-46.

Rebello, C. J., Greenway, F. L., & Finley, J. W. 2014. A review of the nutritional value of legumes and their effects on obesity and its related co-morbidities. *Obesity Reviews*. **15**:392–407.

Redgwell, R. J., Trovato, V., Curti, D., & Fischer, M. 2002. Effect of roasting on degradation and structural features of polysaccharides in Arabica coffee beans. *Carbohydrate Research*. **337**:421–431.

Schmutz, J., Cannon, S. B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D. L., Song, Q., Thelen, J. J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G. D., Yu, Y., Sakurai, T., Umezawa, T., Bhattacharyya, M. K., Sandhu, D., Valliyodan, B., ... Jackson, S. A. 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, **463**: 178–183.

- Shete, S., Tiwari, H., & Elston, R. C. 2000. On estimating the heterozygosity and polymorphism information content value. *Theoretical Population Biology*. **57**:265–271.
- Shimelis, E. A., & Rakshit, S. K. 2005. Antinutritional factors and in vitro protein digestibility of improved haricot bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Ethiopia. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. **56**:377–387.
- Singh, M., Manickavasagan, A., Shobana, S., & Mohan, V. 2020. Glycemic index of pulses and pulse-based products: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **61**:1567–1588.
- Smil, V. 2011. Nitrogen cycle and world food production. *World Agriculture*. **2**:9–13.
- Smith, P. T., Kuo, T. M., & Gerald Crawford, C. 1991. Purification and characterization of galactinol synthase from mature zucchini squash leaves. *Plant Physiology*. **96**:693–698.
- Somiari, Richard I, and Esther Balogh. 1993. Effect of Soaking, Cooking and Crude Alpha-Galactosidase Treatment on the Oligosaccharide Content of Cowpea Flours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **61**:339–43.
- Streeter, J. G., Lohnes, D. G., & Fioritto, R. J. 2001. Patterns of pinitol accumulation in soybean plants and relationships to drought tolerance. *Plant, Cell and Environment*. **24**:429–438.
- Suarez, F. L., Springfield, J., Furne, J. K., Lohrmann, T. T., Kerr, P. S., & Levitt, M. D. 1999. Gas production in humans ingesting a soybean flour derived from beans naturally low in oligosaccharides. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **69**:135–139.
- Thirunathan, P., & Manickavasagan, A. 2019. Processing methods for reducing alpha-galactosides in pulses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **59**:3334–3348.
- Tongwane, M., Mdlambuzi, T., Moeletsi, M., Tsubo, M., Mliswa, V., & Grootboom, L. 2016. Greenhouse gas emissions from different crop production and management practices in South Africa. *Environmental Development*. **19**:23–35.
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. 2017. *World Population Prospects 2017: Data booklet*.
- Van Ha, C., Watanabe, Y., Tran, U. T., Le, D. T., Tanaka, M., Nguyen, K. H., Seki, M., Van Nguyen, D., & Tran, L. S. P. 2015. Comparative analysis of root transcriptomes from two contrasting drought-responsive Williams 82 and DT2008 soybean cultivars under normal and dehydration conditions. *Frontiers in Plant Science*, **6**:1–12.



Vidal-Valverde, C., Frias, J., Prodanov, M., Tabera, J., Ruiz, R., & Bacon, J. 1993. Effect of natural fermentation on carbohydrates, riboflavin and trypsin inhibitor activity of lentils. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*. **197**:449–452.

Wright, S. 1978. Evolution and the genetics of populations, volume IV: Variability within and among natural populations. pp 82-85. The University of Chicago Press, London.

Yu, K., Park, S., & Poysa, V. 1999. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). *Genome*. **42**:27-34

## MATERIAL SUPLEMENTARIO

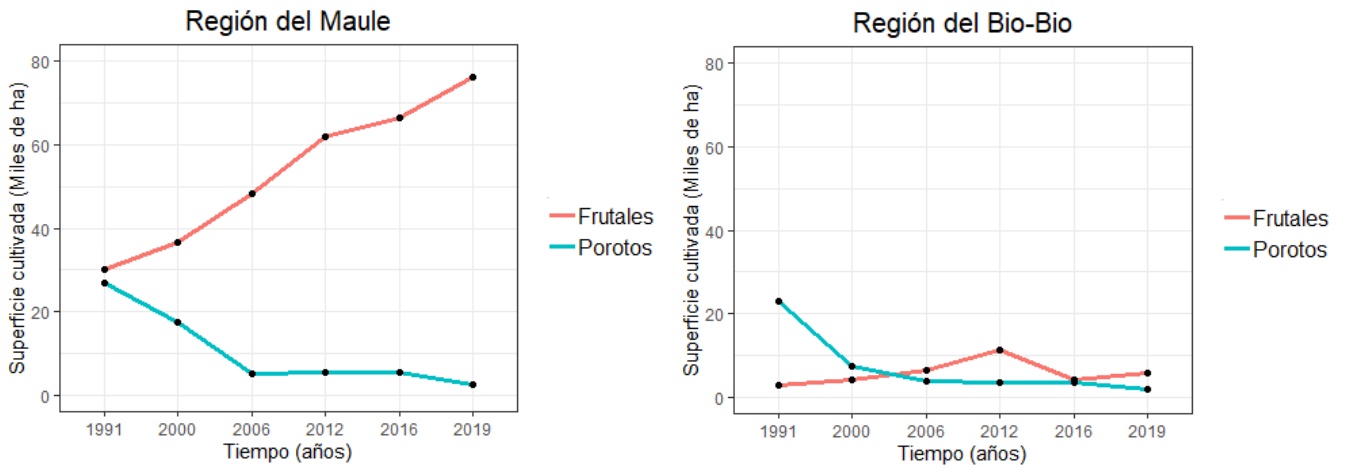


Figura Suplementaria 1: Comparativa de superficie cultivada de *P. vulgaris* vs frutales en regiones de la zona centro-sur del país a lo largo de los últimos 30 años. Los datos fueron recopilados de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA. 2021b, c).

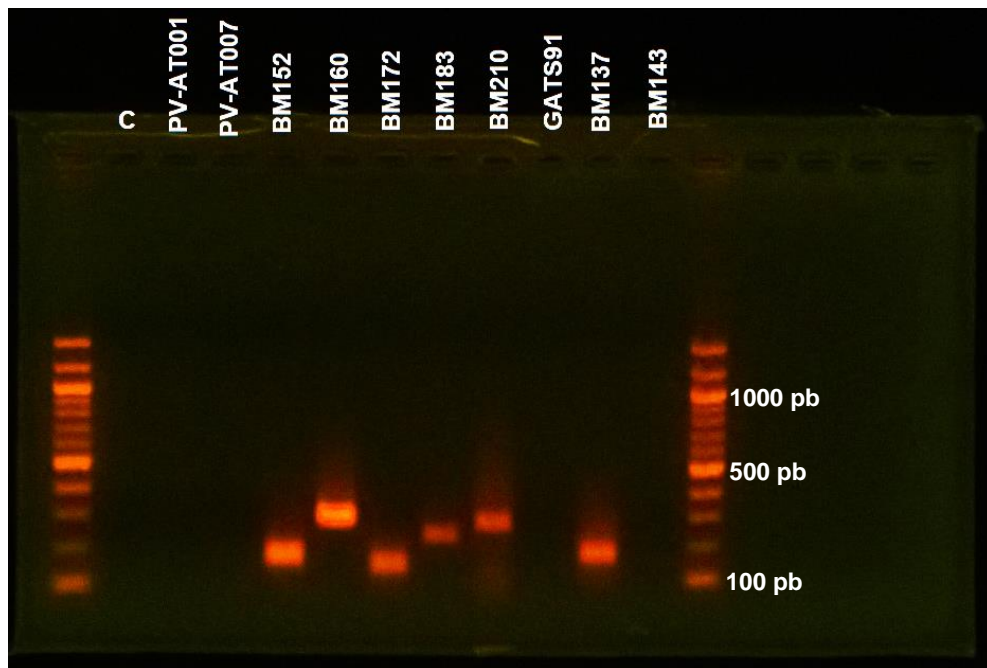


Figura Suplementaria 2: Electroforesis en gel de agarosa 1,8% de los productos de amplificación de todos los SSRs en la variedad local de *P. vulgaris* "Zepellin".

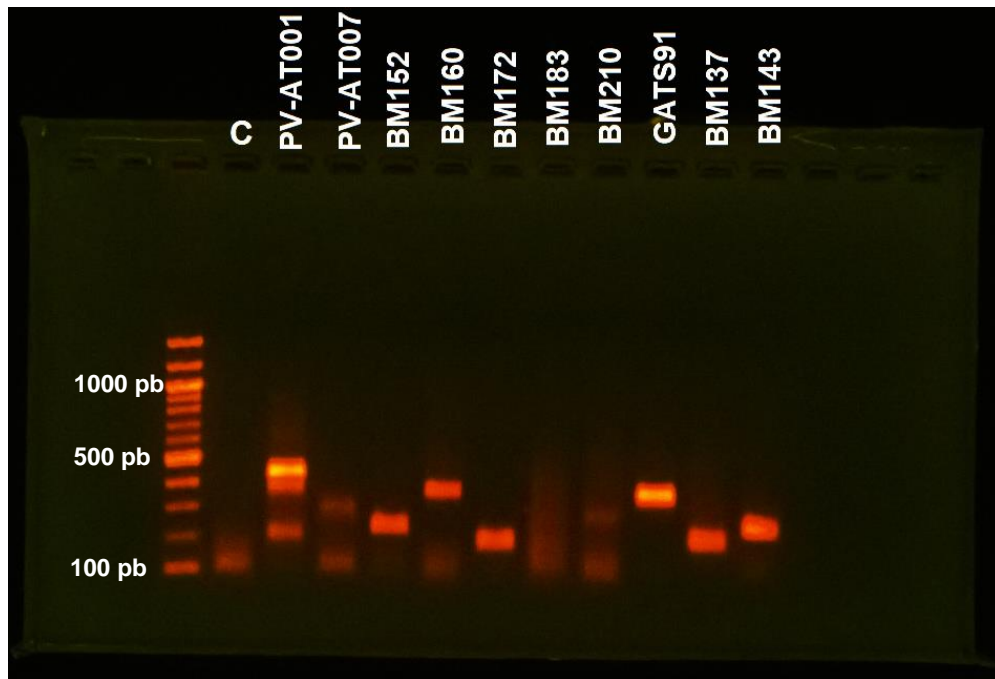


Figura Suplementaria 3: Electroforesis en gel de agarosa 1,8% de los productos de amplificación de todos los SSRs en la variedad local de *P. vulgaris* "Barbucho".

**Tabla Suplementaria I. Contenido de RFOs de 18 variedades locales de grano de la especie *P. vulgaris*.** Los resultados se muestran en orden decreciente según el contenido promedio de oligosacáridos por variedad.

<b>Variedad</b>	<b>RFOs [mmol/100g]</b>
Cranberry	6,353
Variedad 6	5,584
Riñón dorado	5,572
Pinto 114	5,503
Clavel	5,449
Variedad y	5,434
Araucano	5,433
Arroz tuscola	5,188
Zepellin	5,180
Hallado dorado	5,140
Azufrado	5,080
Vino autóctono	5,072
Indiano	4,964
Hallado chico	4,904
Michi-irran	4,642
Juanita	4,421
Bio-Bio	4,145
Orfeo	3,310