

RELACIONES FILOGENÉTICAS DE ESPECIES DE *Phaseolus* DE MÉXICO CON BASE EN MARCADORES DE ADN CLOROPLÁSTICO

PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF *Phaseolus* SPECIES FROM MÉXICO BASED ON CHLOROPLASTIC DNA MARKERS

Villarreal-Villagrán, V. H.; J. S. Muruaga-Martínez; M. L. P. Vargas-Vázquez; N. Mayek-Pérez y S. Hernández-Delgado.

RELACIONES FILOGENÉTICAS DE ESPECIES DE *Phaseolus* DE MÉXICO CON BASE EN MARCADORES DE ADN CLOROPLÁSTICO.

PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF *Phaseolus* SPECIES FROM MÉXICO BASED ON CHLOROPLASTIC DNA MARKERS.



RELACIONES FILOGENÉTICAS DE ESPECIES DE *Phaseolus* DE MÉXICO CON BASE EN MARCADORES DE ADN CLOROPLÁSTICO

PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF *Phaseolus* SPECIES FROM MÉXICO BASED ON CHLOROPLASTIC DNA MARKERS

Villarreal-Villagrán, V. H.;
J. S. Muruaga-Martínez;
M. L. P. Vargas-Vázquez;
N. Mayek-Pérez y
S. Hernández-Delgado.

RELACIONES
FILOGENÉTICAS DE
ESPECIES DE *Phaseolus* DE
MÉXICO CON BASE EN
MARCADORES DE ADN
CLOROPLÁSTICO.

PHYLOGENETIC
RELATIONSHIPS OF
Phaseolus SPECIES FROM
MÉXICO BASED ON
CHLOROPLASTIC DNA
MARKERS.

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 53: 35-51. Enero 2022

DOI:

10.18387/polibotanica.53.3

V. H. Villarreal-Villagrán

Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica.
Blvd. del Maestro s/n esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, 88710,
Reynosa, Tamaulipas, México. Tel./Fax (+52-899) 9243627
<https://orcid.org/0000-0002-5856-4680>

J. S. Muruaga-Martínez

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).
Campo Experimental Valle de México. Coatlinchán, Texcoco, México 56230.
<https://orcid.org/0000-0002-7819-9190>

M. L. P. Vargas-Vázquez

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).
Campo Experimental Valle de México. Coatlinchán, Texcoco, México 56230.
<https://orcid.org/0000-0002-2732-1125>

N. Mayek-Pérez

Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica.
Blvd. del Maestro s/n esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, 88710,
Reynosa, Tamaulipas, México. Tel./Fax (+52-899) 9243627
Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria
Reynosa-Rhode. Carretera Reynosa - San Fernando, cruce con Canal Rodhe
Col. Arcoiris, 88779. Reynosa, México. <https://orcid.org/0000-0001-6960-6287>

S. Hernández-Delgado / shernandezd@ipn.mx

Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica.
Blvd. del Maestro s/n esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, 88710,
Reynosa, Tamaulipas, México.
<https://orcid.org/0000-0002-0962-9599>

RESUMEN: El género *Phaseolus* es originario de México; al menos 31 de las 81 especies conocidas y distribuidas a través de América son endémicas al país. Los estudios filogenéticos en *Phaseolus* deben incluir las especies conocidas y las nuevas especies que se siguen descubriendo. En este trabajo se analizaron las relaciones filogenéticas de 34 accesiones de *Phaseolus* colectadas en México, que incluyeron 19 especies y dos subespecies de *P. coccineus*; tres especies (*P. albiviolaceus*, *P. maculatifolius* y *P. rotundatus*) no se habían incluido en una filogenia. Como grupo externo se incluyó una accesión de *Vigna radiata*. Cinco regiones no codificantes de ADN cloroplástico (ADNc): *trnT-trnL*, *trnL-trnF*, *rpl16*, *rpoC1-rpoC2* y *rps14-psaB* permitieron la reconstrucción filogenética por tres métodos (máxima parsimonia, máxima verosimilitud, análisis Bayesiano de probabilidades posteriores). Los resultados indicaron que el género *Phaseolus* es un grupo monofilético que se subdivide en dos linajes principales: un primer clado formado por *P. pluriflorus*, *P. esperanzae*, *P. pedicellatus*, *P. microcarpus*, *P. glabellus*, *P. oligospermus*, *P. gladiolatus*, *P. zimapanensis* y *P. albiviolaceus* y un segundo clado que incluye *P. filiformis*, *P. acutifolius*, *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. macvaughii*, *P. leptostachyus*, *P. lunatus*, *P. maculatus*, *P. maculatifolius* y *P. rotundatus*. La topología de los subclados

estuvo de acuerdo, en general, con la topología para *Phaseolus* reconocida a la fecha. De las especies no estudiadas previamente *P. albiviolaceus* según su morfología pertenece al grupo *Pedicellatus* pero aquí se ubicó en el grupo *Tuerckheimii*; *P. maculatifolius* y *P. rotundatus* se incluyeron en el grupo *Polystachios*. El clado ancestral de las especies de *Phaseolus* mostró una edad de 4.95 M.a. y la diversificación de los dos clados principales exhibió edad similar (3.8 M.a). La divergencia entre *P. albiviolaceus* y *P. zimapanensis* fue de 0.07 M.a. mientras que entre *P. rotundatus* y *P. maculatifolius* fue de 0.31 M.a.

Palabras clave: Secuenciación de DNA cloroplástico, relaciones filogenéticas, colecta de germoplasma, frijoles silvestres.

ABSTRACT: The *Phaseolus* genus is native to Mexico; at least 31 of the 81 species known and distributed throughout America are endemic to the country. Phylogenetic studies in *Phaseolus* must include known species and new species that continue to be discovered. In this work, the phylogenetic relationships of 34 *Phaseolus* accessions collected in Mexico were analyzed, which included 19 species and two subspecies of *P. coccineus*; three species (*P. albiviolaceus*, *P. maculatifolius* and *P. rotundatus*) had not been included in a phylogeny. As an external group, an accession of *Vigna radiata* was included. Five non-coding regions of chloroplast DNA (cDNA): *trnT-trnL*, *trnL-trnF*, *rpl16*, *rpoC1-rpoC2*, and *rps14-psaB* allowed phylogenetic reconstruction by three methods (maximum parsimony, maximum likelihood, Bayesian analysis of posterior probabilities). The results indicated that the *Phaseolus* genus is a monophyletic group that is subdivided into two main lineages: a first clade formed by *P. pluriflorus*, *P. esperanzae*, *P. pedicellatus*, *P. microcarpus*, *P. glabellus*, *P. oligospermus*, *P. gladiolatus*, *P. zimapanensis*, and *P. albiviolaceus*; and a second clade that includes *P. filiformis*, *P. acutifolius*, *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. macvaughii*, *P. leptostachyus*, *P. lunatus*, *P. maculatus*, *P. maculatifolius*, and *P. rotundatus*. The topology of the subclades was in general agreement with the topology for *Phaseolus* recognized to date. Of the species not previously studied, *P. albiviolaceus* belongs to the *Pedicellatus* group according to its morphology, but here it was located at *Tuerckheimii* group; *P. maculatifolius* and *P. rotundatus* were included in the *Polystachios* group. The ancestral clade of the *Phaseolus* species showed an age of 4.95 M.a. and the diversification of the two main clades exhibited similar age (3.8 M.a). The divergence between *P. albiviolaceus* and *P. zimapanensis* was 0.07 M.a. while between *P. rotundatus* and *P. maculatifolius* it was 0.31 M.a.

Key words: Chloroplast DNA sequencing, phylogenetic relationships, germplasm collection, wild beans.

INTRODUCCIÓN

El género *Phaseolus* es originario de América y pertenece a la familia Leguminosae (Fabaceae), sub-familia Papilionoideae y tribu Phaseoleae. El género *Phaseolus* es monofilético y comprende 81 especies y, alrededor de 30 taxa infra específicos, conforman ocho grupos filogenéticos dentro de dos clados (Debouck, 2021; Delgado-Salinas *et al.*, 2006; Dohle *et al.*, 2019; Freytag & Debouck, 2002; Ramírez-Villegas *et al.*, 2010). Cinco especies se han domesticado: *Phaseolus vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray y *P. polyanthus* Greenman [sin. *P. dumosus*] y dicho proceso ocurrió en distintos eventos prehistóricos y en diversas áreas geográficas de América (Hernández-López *et al.*, 2013).

En el territorio mexicano las especies endémicas del género *Phaseolus* representan un recurso genético importante. De las especies descritas (Debouck, 2021; Freytag & Debouck, 2002) al menos 31 son endémicas de México, lo que lo convierte en el país con la mayor biodiversidad del género (Debouck, 2021). Sin embargo, la mayor parte de los estudios relacionados con *Phaseolus*, así como las colecciones de recursos fitogenéticos del mismo se han centrado principalmente en *P. vulgaris* y, en menor medida, en el resto de las especies domesticadas del género: *P. lunatus*, *P. coccineus*, *P. acutifolius* y *P. polyanthus* (Dohle *et al.*, 2019).

El marcado interés en *P. vulgaris* se entiende si consideramos que el frijol común, por su alto valor nutricional y otras cualidades, es una de las leguminosas de mayor cultivo, distribución y consumo en México y otros países de Latinoamérica y África, principalmente. A pesar de que se le atribuye una importancia creciente al estudio de las especies silvestres como reservorio potencial de rasgos y fenotipos valiosos con fines de mejoramiento genético (Acosta-Gallegos *et al.*, 2007), existen pocos estudios sobre la genética de las especies silvestres de *Phaseolus*.

El estudio de 70 especies de *Phaseolus* con base en ITS/5.8 S de DNA y los loci *trnK* y *matK* del cpDNA indicó que *Phaseolus* es un género monofilético con dos clados principales que luego se ramifican en ocho clados con todas las especies excepto cinco ‘enigmáticas’ (*P. glabellus*, *P. macrolepis*, *P. microcarpus*, *P. oaxacanus* y *P. talamancensis*) o ‘incertae sedis’. Los ocho clados muestran rasgos morfológicos, ecológicos y biogeográficos distintivos (Delgado-Salinas *et al.*, 2006). La edad del clado troncal de *Phaseolus* es de 6 a 8 millones de años y la diversificación de los ocho clados ocurrió hace 1 - 2 millones de años, después que cesó la actividad tectónica en la Cordillera Volcánica Trans mexicana (Alva-Valdivia *et al.*, 2000). Entre los ocho clados de *Phaseolus*, el grupo más ancestral es *vulgaris* con cerca de cuatro millones de años de antigüedad, mientras que el más derivado incluye a *filiformis*, *pedicellatus* y *polystachios* con \approx 1 millón de años (Delgado-Salinas *et al.*, 2006). Por su parte, Servin y Márquez-Ortiz (2007) identificaron nueve subclados al analizar la filogenia de diversas especies de *Phaseolus*, y coincidieron en señalar cuatro especies sin resolverse (*P. glabellus*, *P. macrolepis*, *P. microcarpus* y *P. oaxacanus*) como lo reportaron Delgado-Salinas *et al.* (2006).

El conocimiento detallado de las relaciones filogenéticas de *Phaseolus* es esencial en el entendimiento del origen y diversificación genética (Smýkal *et al.*, 2015), así como para su conservación, aprovechamiento y su mejoramiento genético (López Soto *et al.*, 2005; Meza-Vázquez *et al.*, 2015). Este trabajo se llevó a cabo para analizar las relaciones filogenéticas de especies de *Phaseolus* de México con base en marcadores moleculares de ADN cloroplástico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo y Extracción del ADN

Se trabajó con semillas de 34 accesiones representando 19 especies de *Phaseolus*, incluyendo dos subespecies de *P. coccineus*, colectadas en diferentes sitios de México (Tabla 1). Las especies en estudio, salvo *P. albiviolaceus*, *P. maculatifolius* y *P. rotundatus*, se incluyeron en la filogenia disponible del género (Delgado-Salinas *et al.*, 2006), para poder comparar mejor el trabajo realizado aquí. Las semillas de cada accesión se escarificaron con un bisturí para romper la testa y facilitar la germinación (Lépiz-Ildefonso *et al.*, 2010), luego se sembraron en una mezcla de tierra de campo, turba y perlita (1:1:1 peso: peso: peso) (Lépiz-Ildefonso *et al.*, 2010). Las muestras de tejido se tomaron de trifolios jóvenes completamente expandidos y los mismos se lavaron con agua estéril. Las muestras se conservaron a -70° C hasta su uso. Para el aislamiento del ADN genómico se utilizaron diferentes métodos: Wizard Genomic de Promega® (Madison, EUA); DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen® (Hilden, Alemania) y CTAB (Cota-Sánchez *et al.*, 2006), recomendado para especímenes de herbario y tejidos mucilaginosos. Las muestras obtenidas se re-suspendieron en TE a 0.1X de concentración y se almacenaron a -20° C hasta su uso y la visualización y cuantificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando como referencia al DNA del fago λ (Invitrogen) y el sistema ‘Molecular Imager Gel Doc XR’ marca Bio-Rad® (Hercules, EUA). Las muestras de DNA se diluyeron a una concentración de $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

Tabla 1. Accesiones y especies del género *Phaseolus* seleccionadas para realizar el análisis filogenético.

Espece	Origen	Latitud Norte	Longitud Oeste	Altitud (m s.n.m.)
<i>P. acutifolius</i>	Morelos	19.01	98.99	2090
<i>P. acutifolius</i>	Chihuahua	27.01	107.74	591
<i>P. acutifolius</i>	Durango	24.0287	104.69	1890
<i>P. coccineus griseus</i>	Jalisco	20.55	102.51	1902
<i>P. coccineus striatus</i>			Desconocido	
<i>P. esperanzae</i> Seaton	Puebla	18.86	97.37	2470
<i>P. filiformis</i>	Baja California Sur	24.96	111.88	17
<i>P. filiformis</i>	Durango	24.86	103.69	1648
<i>P. filiformis</i>	Coahuila	25.52	103.46	1131
<i>P. glabellus</i>	Tamaulipas	23.03	99.15	751
<i>P. glabellus</i>	San Luis Potosí	21.26	98.79	1153
<i>P. leptostachyus</i> Benth	Veracruz	20.54	98.48	2152
<i>P. lunatus silvestre</i>	Campeche	18.66	90.37	131
<i>P. maculatus</i>	Coahuila	26.99	102.06	726
<i>P. maculatus</i>	Puebla	19.18	97.99	3259
<i>P. microcarpus</i>	Durango	25.18	104.56	1350
<i>P. pedicellatus</i> Benth	Hidalgo	20.16	98.20	2208
<i>P. pluriflorus</i>	Veracruz	20.54	98.48	2152
<i>P. zimapanensis</i> Delgado	Tamaulipas	23.61	99.22	620
<i>P. zimapanensis</i> Delgado	Hidalgo	20.74	99.38	2478
<i>P. macvaughii</i>	Guerrero	17.64	101.55	25
<i>P. vulgaris</i>	Morelos	18.73	99.34	980
<i>P. vulgaris</i>	Jalisco	20.09	103.86	1700
<i>P. oligospermus</i> Piper	Chiapas	16.83	93.09	1175
<i>P. gladiolatus</i> Freytag y Debouck	San Luis Potosí	22.67	100.42	2100
<i>P. maculatifolius</i> Freytag y Debouck	Nuevo León	23.97	99.77	1960
<i>P. albiviolaceus</i> Freytag y Debouck	Tamaulipas	22.60	99.03	900
<i>P. leptostachyus</i> Benth	Jalisco	19.68	103.60	2200
<i>P. zimapanensis</i> Delgado	Hidalgo	20.74	99.38	1800
<i>P. lunatus silvestre</i>	Veracruz	20.45	97.38	149
<i>P. rotundatus</i> Freytag y Debouck	Oaxaca	17.46	97.26	2140
<i>P. lunatus silvestre</i>	Tamaulipas	22.40	97.93	20
<i>P. rotundatus</i> Freytag & Debouck	Jalisco	20.87	102.79	1990
<i>P. glabellus</i> Piper	Veracruz	19.56	96.93	1500

Análisis de ADN cloroplástico

La selección de las regiones de ADN cloroplástico a amplificar por PCR se basó en Chacón *et al.* (2007) quienes exploraron diez regiones no codificantes de ADN de cloroplasto (ADNc) incluyendo varios espaciadores inter génicos e intrones principalmente de la región grande de copia única (Tabla 2). Los oligonucleótidos se diluyeron a 10 μ M en TE 1X. Los ensayos de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Bio-Rad iCycler de 96 pocillos para tubos Eppendorf de 0.2 mL utilizando la siguiente mezcla de reacción: 1.0 μ L de DNA genómico (20 ng), 2.0 μ L de cada iniciador ('Sentido' y 'Anti-sentido') 0.5 μ M, 0.8 μ L de cada deoxinucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 0.2 mM, 0.3 μ L de *Taq* DNA polimerasa (1.5 U), 8.0 μ L de la solución amortiguadora, 3.2 μ L de MgCl 2 mM y agua Milli-Q para un volumen final de 40 μ L. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo inicial de 94 °C por 1 min; 30 ciclos de tres pasos incluyendo desnaturalización a 94 °C por 1 min, acoplamiento a 52 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 2 min; y un ciclo de extensión final de 72 °C por 10 min. Para la amplificación del intrón *rpl16* la temperatura de extensión se cambió a 65 °C y para el espaciador *rps14-psaB* la concentración de los dNTPs se optimizó a 0.05 mM,

mientras que el número de ciclos de PCR se aumentó de 30 a 45. La purificación de los productos de DNA amplificados se realizó utilizando dos protocolos. Los productos menores a 1000 pb se purificaron con el estuche comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega® (Madison, EUA). Para el caso de los productos amplificados mayores a 1000 pb se utilizó el protocolo de purificación del estuche comercial ExoSAP-IT® (Cleveland, EUA). Las muestras con DNA obtenidas con ambos protocolos se almacenaron a -20 °C y su cuantificación se llevó a cabo con el protocolo para cuantificar DNA genómico.

Tabla 2. Regiones e iniciadores para amplificación por PCR (Chacón *et al.*, 2005).

Región de cpDNA	Iniciadores (5' - 3') para PCR	Sentido	Temperatura de hibridación (°C)	Tamaño amplificado (bp)	Referencia
Espaciador <i>trnT-trnL</i>	CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT	Sentido	52	800	Taberlet <i>et al.</i> (1991)
	TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC	Anti-sentido			
Intrón <i>trnL</i>	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	Sentido	52	630	Taberlet <i>et al.</i> (1991)
	GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC	Anti-sentido			
Espaciador <i>trnL-trnF</i>	GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC	Sentido	52	530	Taberlet <i>et al.</i> (1991)
	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	Anti-sentido			
Intrón <i>rpl16</i>	CCA ACA CAT ACA TTC GGA TT	Sentido	52	1210	Jordan <i>et al.</i> (1996) Rediseñado por Chacón <i>et al.</i> (2005)
	GCT CCT CGC GAA TGA AGT AA	Anti-sentido			
Espaciador <i>rpoC1-rpoC2</i>	GAA GTT CAC TAT GAA TCT	Sentido	52	1700	Asmussen y Liston (1996)
	TTN GGT ACC TAG ACA TCG GTA CTC CAG TGC	Anti-sentido			
Espaciador <i>atpβ-rbcL</i>	GAA GTA GTA GGA TTG ATT CTC	Sentido	50	950	Manen <i>et al.</i> (1994)
	TAC AGT TGT CCA TGT ACC AG	Anti-sentido			
Espaciador <i>rps14-psaB</i>	CAT TTC ACG AAG TAT GTG	Sentido	55	600	Fofana <i>et al.</i> (1997)
	TCC G TGG CGT GGA TAT TGG CAG GA	Anti-sentido			
Región <i>petA-psbE</i>	GCA TCT GTT ATT TTG GCA CA	Sentido	53	1200	Fofana <i>et al.</i> (1997)
	TAC CTT CCC TAT TCA TTG CG	Anti-sentido			
Espaciador <i>accD-psaI</i>	GGA AGT TTG AGC TTT ATG	Sentido	55	700	Small <i>et al.</i> (1998)
	CAA ATG G AGA AGC CAT TGC AAT TGC CGG AAA	Anti-sentido			
Intrón <i>ndhA a</i>	GGW CTT CTY ATG KCR GGA	Sentido	42	1500	Small <i>et al.</i> (1998)
	TAT RGM TC CTG YGC TTC MAC TAT ATC AAC TGT AC	Anti-sentido			

Análisis de secuencias

La secuenciación de los productos de la amplificación por PCR se realizó mediante electroforesis capilar por el método dideoxi (Sanger *et al.*, 1977). Aquí se utilizaron los terminadores BigDye® v3.1 en un secuenciador Applied Biosystems modelo 3730xl. Los productos de amplificación (10 µL a 2.0 µM) se secuenciaron a una concentración de 30 a 50 ng µL⁻¹. Las secuencias de los productos de PCR se procesaron en formato fasta, seq y abi. Para el ensamble del par de secuencias generadas para cada producto de PCR se utilizó el programa Sequencher 4.1.4 de Gene Codes (Ann Arbor, EUA). La integración de los ‘contigs’ se facilitó al usar como referencia la secuencia del genoma cloroplástico de *P. vulgaris* variedad Negro Jamapa (Guo *et al.*, 2007). La edición de las secuencias se realizó con criterios conservadores como el recorte de los extremos de las secuencias que mostraban nivel de calidad en la lectura menor a una puntuación de QV20 en la escala del programa Sequence Scanner 1.0 (Applied Biosystems; Foster City, EUA). En los casos donde hubo discrepancias entre un par de secuencias complementario sólo se consideraron como válidas aquellas bases donde al menos uno de los trazos de los electroferogramas no admitía ambigüedad y podía corroborarse con la secuencia de referencia. Para polarizar la filogenia se incluyó como grupo externo a *Vigna radiata*, cuyo genoma completo fue publicado previamente (Tangphatsornruang *et al.*, 2010). La monofilia de *Phaseolus* se determinó previamente (Delgado-Salinas *et al.*, 2006).

Análisis filogenético

El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo con el método MUSCLE en el programa MEGA (Edgar, 2004) en 16 iteraciones para cada región. El alineamiento múltiple de las regiones cloroplásticas en matrices individuales se concatenó directamente taxón por taxón (Kupczok *et al.*, 2010). Para determinar los parámetros óptimos para la reconstrucción filogenética de las especies estudiadas primero se realizó un análisis de verosimilitud con el programa jModelTest (Schwarz, 1978) aplicando dos criterios informáticos: el AIC o ‘Akaike Information Criteria’ (Akaike, 1998) y el BIC o ‘Bayesian Information Criteria’. Para la reconstrucción filogenética se utilizaron tres métodos: máxima parsimonia, máxima verosimilitud y análisis Bayesiano de probabilidades posteriores. En el primer caso se generó un árbol filogenético de expansión mínima por el método de parsimonia con ‘DNAPARS’ del paquete PHYLIP v3.52 (Felsenstein, 1993) y el uso del algoritmo NNI (‘nearest neighbor interchange’) a través de la interfase bioinformática del programa Seaview (Gouy *et al.*, 2010). Para el análisis de máxima verosimilitud se utilizó el algoritmo de Guindon & Gascuel (2003) con el programa Seaview. El análisis Bayesiano de probabilidad posterior se realizó con el programa MrBayes versión 3.1.1 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) en la interfase del programa Geneious versión 5.1 (Drummond *et al.*, 2011). En los dos últimos análisis se utilizó el modelo de sustitución nucleotídica GTR (‘General Time Reversible’) y la distribución *gamma* con cuatro categorías de variación entre sitios recomendadas por el programa jModelTest; el modelo seleccionado generó la menor puntuación BIC (Posada, 2008).

Estimación de tiempos de divergencia

Con el programa BEAST (‘Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees’) versión 2.3.1 se estimaron la tasa de evolución y los tiempos de divergencia de las ramas en los árboles generados. Con BEAUti (‘Bayesian Evolutionary Analysis Utility’) versión 2.3.1 se convirtieron los alineamientos de secuencias del formato NEXUS al formato XML, propio de BEAST. El modelo de evolución nucleotídica fue el utilizado previamente con jModelTest (Posada, 2008) y que dio el mejor ajuste para el tipo de datos, GTR con una distribución *gamma* con cuatro categorías y auto estimación de la tasa de sustitución. Luego, se utilizó un Reloj Molecular Relajado (Relaxed Clock Log Normal) donde las tasas de sustitución pueden variar de manera continua a lo largo de cada rama. En el parámetro Árbol (Tree) de la pestaña de probabilidades *a priori* (Priors) se seleccionó el Modelo Yule, en el cual la tasa de especiación es constante a través del tiempo. Para inferir tiempos absolutos de divergencia se introdujo un punto de calibración como distribución de probabilidad *a priori* en el nodo del ancestro común más reciente entre *P. coccineus* y *V. radiata*, con un valor medio de 8.0 millones de años y un valor *sigma* de 0.5. Dichos valores se obtuvieron de análisis evolutivos

de filogenias de plástidos pertenecientes a la familia Leguminosae (Fabaceae) donde se utilizaron registros fósiles de la era Terciaria como marco de referencia temporal absoluta (Lavin *et al.*, 2005). Con dichos parámetros se realizaron dos corridas independientes y en cada una se generaron 10'000,000 iteraciones MCMC, con un descarte del 20% de las mismas como "burn-in". Los resultados de BEAST se analizaron con el programa Tracer v1.6 para corroborar el tamaño efectivo de la muestra (ESS) y valorar que los productos posteriores obtenidos fueran superiores a 200. El total de árboles resultantes se combinaron en un solo archivo mediante el programa LogCombiner v2.3.1, de donde se seleccionó el árbol con la credibilidad máxima de 95% usando el programa TreeAnnotator versión 2.3.1.

RESULTADOS

La evaluación preliminar de diez regiones de ADN cloroplástico resultó en la selección de cinco: espaciador *trnT-trnL*, espaciador *trnL-trnF*, intrón *rpl16*, espaciador *rpoC1-rpoC2* y espaciador *rps14-psaB* (Tabla 2). La longitud en pares de bases y el número de sitios idénticos en cada matriz de las cinco regiones cloroplásticas indicó porcentajes de identidad desde 90.8 (espaciador *trnT-trnL*) hasta 98.9% (*rpoC1-rpoC2*); con un promedio del 95.2%. La variación observada incluyó tanto polimorfismos puntuales como inserciones y supresiones. La matriz combinada de las cinco regiones fue de 35 x 4475, con 310 sitios informativos (Tabla 3). El análisis de conglomerados por los tres métodos utilizados (máxima parsimonia, máxima verosimilitud y enfoque Bayesiano) produjo árboles filogenéticos con topologías similares y conformados por tres clados. El primero corresponde al grupo externo (*V. radiata*) y que polariza la filogenia de *Phaseolus* spp. En el segundo clado se agruparon nueve especies: *P. pluriflorus*, *P. esperanzae* (grupo Pauciflorus), *P. pedicellatus* (grupo Pedicellatus) (subclado 2a), *P. microcarpus*, *P. glabellus* (grupo Incertae sedis), *P. oligospermus*, *P. gladiolatus*, *P. zimapanensis* y *P. albiviolaecus* (grupo Tuerckheimii) (subclado 2b), todas especies silvestres. En el tercer clado se incluyen las diez especies restantes: *P. filiformis* (grupo Filiformis), *P. acutifolius*, *P. coccineus griseus*, *P. coccineus striatus*, *P. vulgaris* (grupo Vulgaris) (suclado 3a), *P. macvaughii*, *P. leptostachyus* (grupo Leptostachyus), *P. lunatus* (grupo Lunatus), *P. maculatus*, *P. rotundatus* y *P. maculatifolius* (grupo Polystachios) (subclado 3b); aquí se incluyen las especies domesticadas de *Phaseolus* representadas (*P. acutifolius*, *P. coccineus*, *P. vulgaris*, *P. lunatus*) (Figs. 1 a 3).

Tabla 3. Estadísticos descriptivos de los alineamientos múltiples obtenidos con cinco regiones cloroplásticas secuenciadas en 19 especies de *Phaseolus*. La última fila representa los valores de la concatenación de todas las regiones. En estos datos no se incluyó la secuencia testigo (*V. radiata*).

Región	Longitud (pb)	No. Sitios Idénticos	Sitios Idénticos (%)	Identidad por pares (%)	Contenido de GC (%)
<i>trnT-trnL</i>	849	572	67.37	90.8	17.9
<i>trnL-trnF</i>	552	401	72.64	94.1	25.0
<i>rpl16</i>	822	632	76.89	93.7	22.7
<i>rpoC1-rpoC2</i>	1643	1548	94.22	98.9	36.4
<i>rps14-psaB</i>	609	567	93.10	98.3	37.6
Súper matriz	4475	3720	83.13	95.2	29.1

pb = pares de bases, GC = Guanina-Citosina

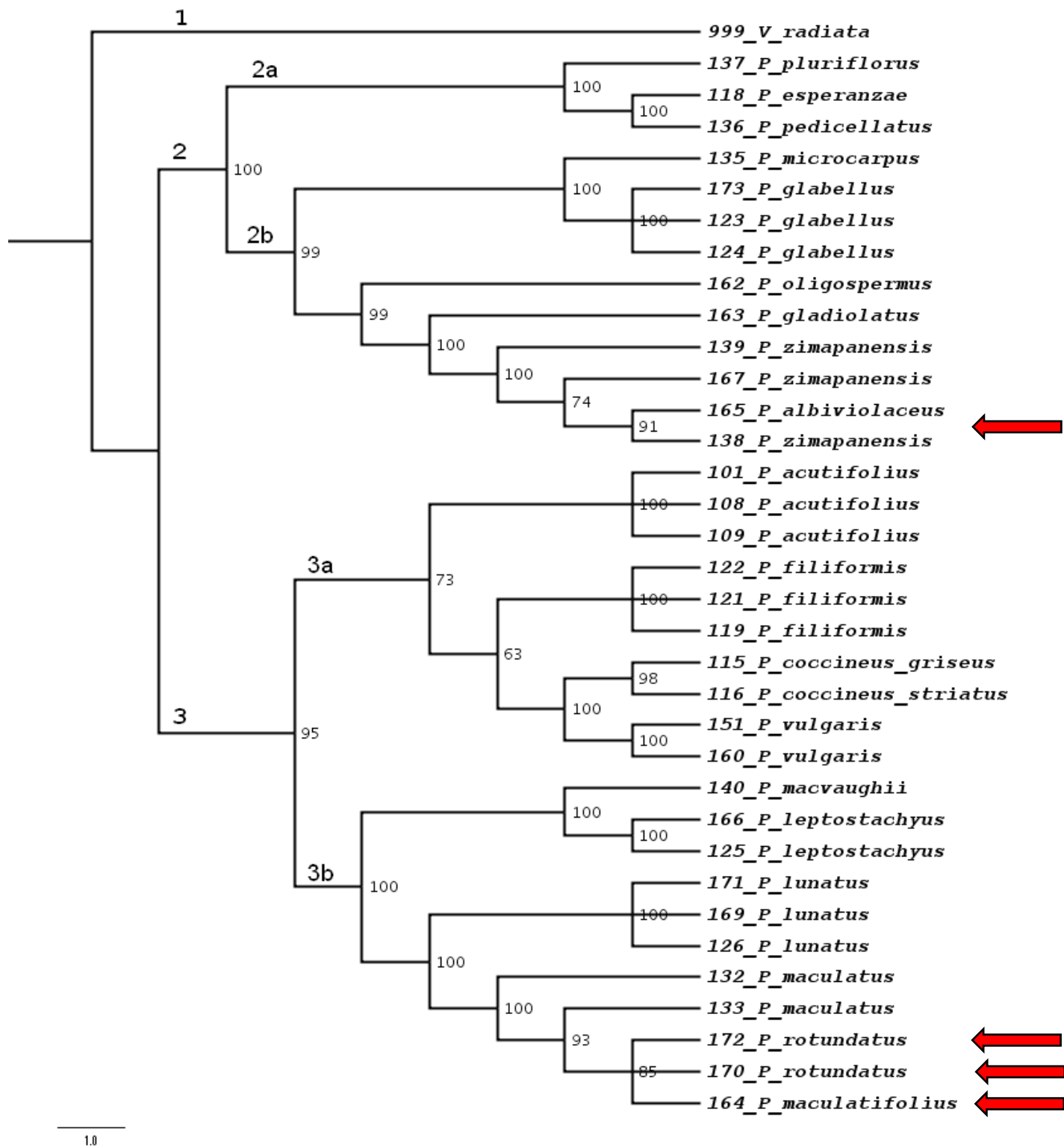


Fig. 1. Cladograma de Máxima Parsimonia de 19 especies de *Phaseolus* de México. Los números al lado de los nodos indican los valores del análisis de robustez en porcentaje. Las flechas indican las especies no analizadas anteriormente.

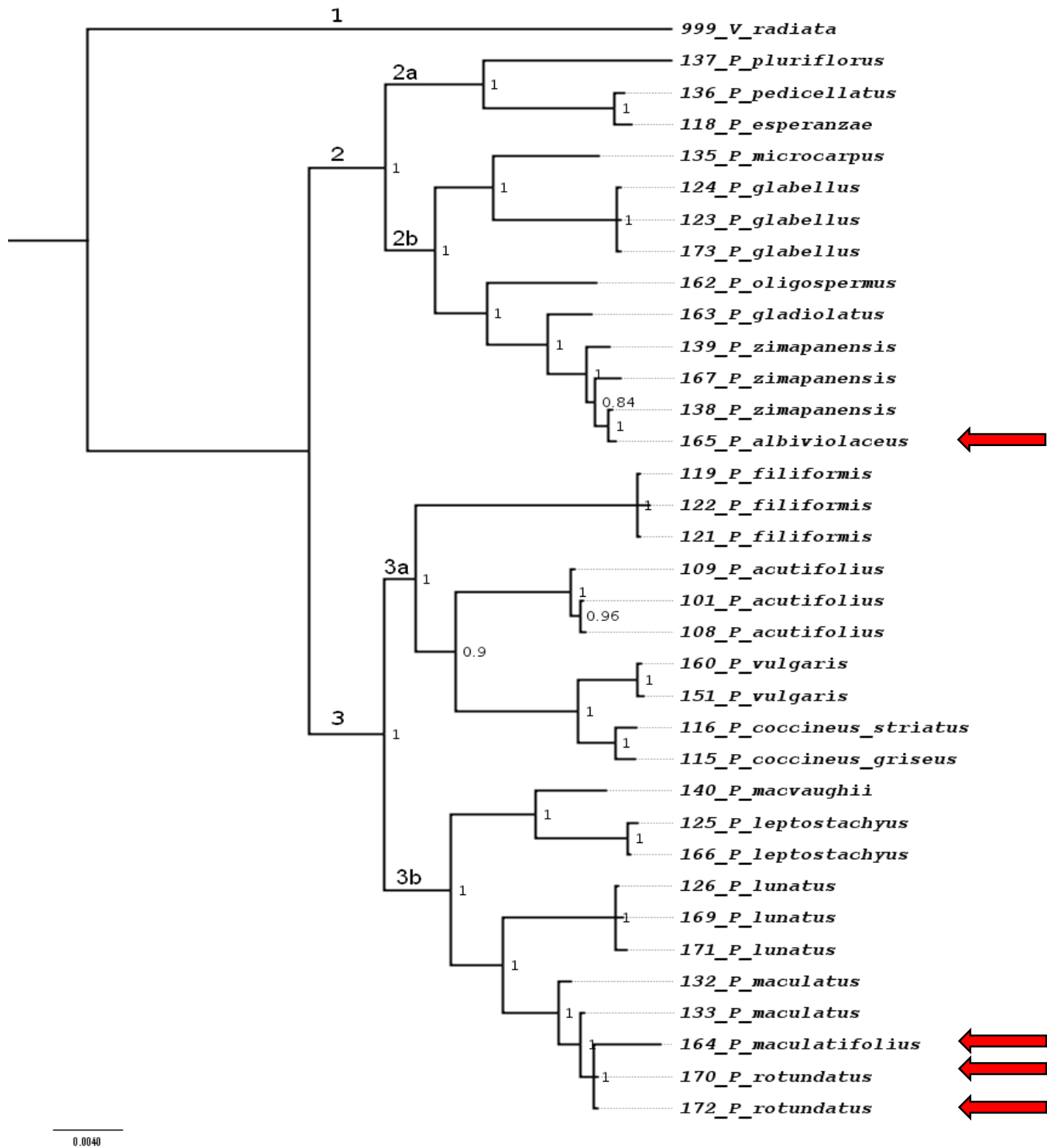


Fig. 3. Dendrograma Bayesiano de productos posteriores de 19 especies de *Phaseolus* de México. La probabilidad posterior se muestra en cada nodo donde 1 = 100%. Las flechas indican las especies no analizadas anteriormente.

Los tiempos de divergencia estimados entre especies van desde 7.97 M.a., que corresponden al nodo de calibración donde se unen las especies de *Phaseolus* con el grupo externo *Vigna*, hasta los 0.31 M.a. en el caso del ancestro en común más reciente de *P. rotundatus* y *P. maculatifolius*. Como es de esperarse, los nodos intraespecies muestran tiempos de divergencia aún menores. El clado ancestral de todas las especies de *Phaseolus* incluidas en este estudio aparece con una edad de 4.95 M.a. La diversificación de los dos clados principales de *Phaseolus*, muestra esencialmente la misma edad de 3.8 M.a. El subclado 2a (*P. pluriflorus*, *P. esperanzae*, *P. pedicellatus*) muestra una edad de 2.39 M.a., mientras que el subclado 2b (*P. microcarpus*, *P. glabellus*, *P. oligospermus*, *P. gladiolatus*, *P. zimapanensis* y *P. albiviolaes*) tiene 2.87 M.a. El subclado 3a (*P. filiformis*, *P. acutifolius*, *P. coccineus striatus*, *P. coccineus griseus* y *P. vulgaris*) muestra una edad de 3.26 M.a. y el subclado 3b (*P. macvaughii*, *P. leptostachyus*, *P. lunatus*, *P. maculatus*, *P. maculatifolius* y *P. rotundatus*) tiene 2.68 M.a. La divergencia entre *P. albiviolaes* y *P. zimapanensis* fue de 0.07 M.a.; mientras que entre *P. rotundatus* y *P. maculatifolius* fue de 0.31 M.a. La divergencia genética entre *P. vulgaris* y su más cercana rama monofilética, *P. coccineus*, ocurrió hace aproximadamente 0.91 M.a. (Fig. 4).

DISCUSIÓN

En este trabajo se ratificó que el género *Phaseolus* es un grupo monofilético que se subdivide en dos linajes principales: uno incluye a las especies *P. pluriflorus*, *P. esperanzae*, *P. pedicellatus*, *P. microcarpus*, *P. glabellus*, *P. oligospermus*, *P. gladiolatus*, *P. zimapanensis* y *P. albiviolaes* y otro a las especies *P. filiformis*, *P. acutifolius*, *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. macvaughii*, *P. leptostachyus*, *P. lunatus*, *P. maculatus*, *P. maculatifolius* y *P. rotundatus*. La topología de los subclados estuvo de acuerdo, en general, con la topología para *Phaseolus* reconocida a la fecha.

Delgado-Salinas *et al.* (2006) determinaron la filogenia de 70 especies de *Phaseolus* mientras que aquí se analizaron 19 especies y dos subespecies de *Phaseolus* colectadas durante 2009 y 2010, Delgado-Salinas *et al.* (1999) combinaron marcadores moleculares de origen nuclear (ITS) así como de origen cloroplástico; aquí se usaron marcadores cloroplásticos. Nuestros resultados coinciden con Delgado-Salinas *et al.* (2006) en cuanto a la conformación de los clados y subclados; así como en los valores de soporte, cuando se consideran datos de loci cloroplásticos. En nuestro caso, los tres métodos de análisis estadístico produjeron árboles filogenéticos con topologías similares y con altos niveles de robustez estadística. Con máxima parsimonia, se observa el 85% de los nodos con valores de soporte mayores al 90%; mientras que con máxima verosimilitud y enfoque Bayesiano los valores fueron del 81 y 96%, respectivamente.

De las 19 especies aquí incluidas hay tres que no se incluyen en estudios previos de taxonomía de *Phaseolus* basada en caracteres moleculares: *P. albiviolaes*, *P. maculatifolius* y *P. rotundatus*. La filogenia derivada de las cinco regiones cloroplásticas concuerda con el agrupamiento global de *Phaseolus* spp. de Delgado-Salinas *et al.* (1999), indicando que el género es monofilético y que se ramifica en dos grandes linajes o clados. Delgado-Salinas *et al.*, (1999) reportan que los dos linajes principales se ramifican a su vez en ocho subclados específicos con valores de soporte mayores a 95%; mientras que Servin L E y Márquez-Ortiz Y. (2007) reportan nueve sub-clados con algunas especies que no lograron resolverse.

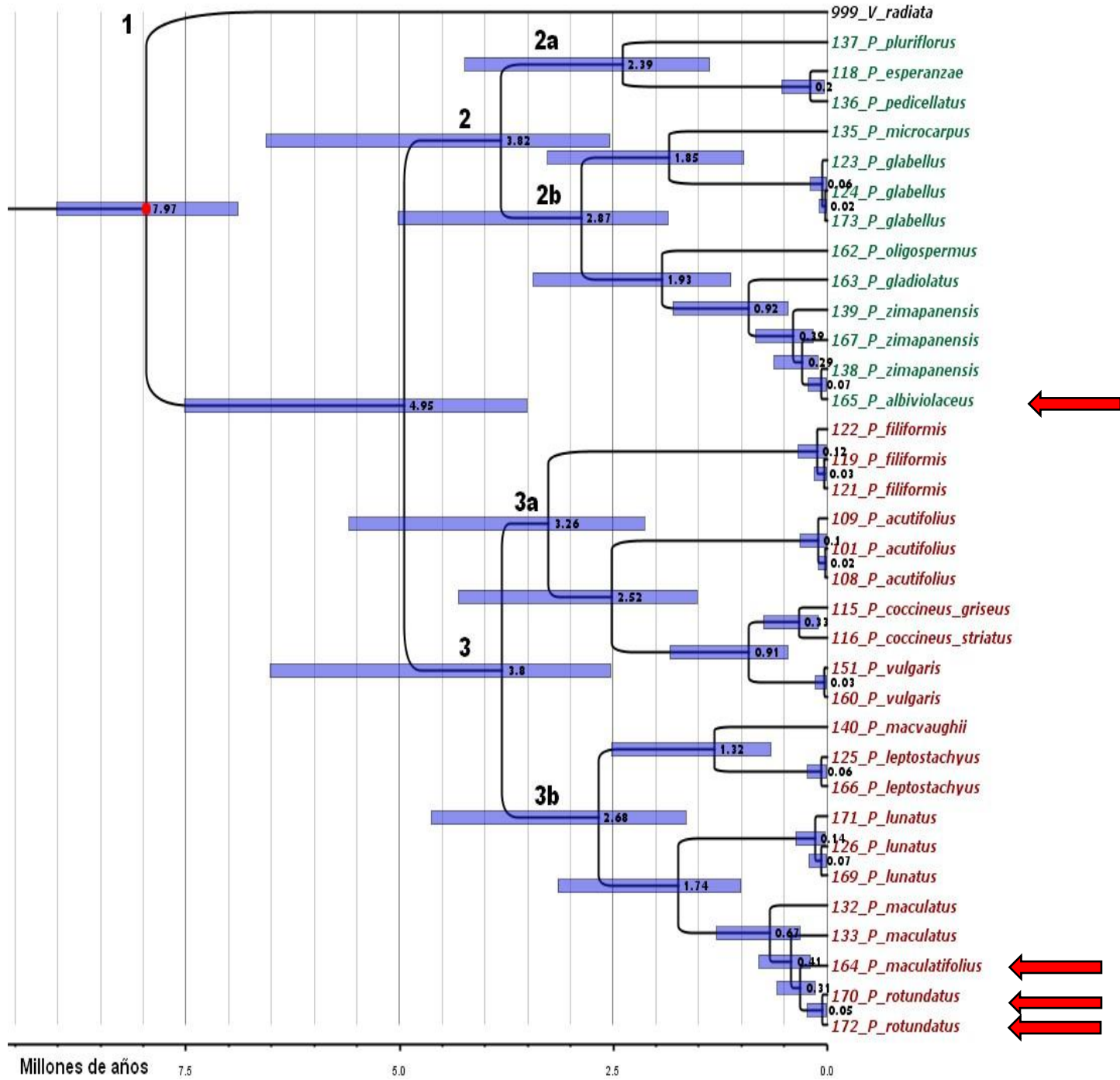


Fig. 4. Tiempos de divergencia entre especies de *Phaseolus* de México con base en análisis Bayesiano. El punto rojo indica la calibración cronológica *a priori* de ocho millones de años como restricción mínima. Las barras moradas sobre cada nodo representan los intervalos de credibilidad de 95% que incluyen su edad. Las flechas indican las especies no analizadas anteriormente.

El primer clado principal incluye los grupos Pauciflorus, Pedicellatus y Tuerckheimii; el segundo a Filiformis, Vulgaris, Leptostachyus, Lunatus y Polystachios. Las especies aquí incluidas también se agruparon dentro de los clados y sub-clados descritos por Delgado-Salinas *et al.* (2006). *P. pluriflorus* aparece como un taxón terminal independiente, porque es la única especie representada del grupo Pauciflorus. Sin embargo, el taxón de *P. pluriflorus* se asocia estrechamente con el nodo inter-específico que une a los grupos Pauciflorus y Pedicellatus (Delgado-Salinas *et al.*, 1999). En este trabajo, tanto *P. maculatifolius* como *P. rotundatus* aparecen junto con *P. maculatus* en el grupo Polystachios dentro del segundo clado principal, como lo indicó la clasificación morfológica de Freytag & Debouck (2002). Además, el grupo que aparece no resuelto en la filogenia de Delgado-Salinas *et al.* (2006) e *Incertae sedis* en este estudio se presenta invariablemente como un sub-clado distinto. El primer clado incluyó especies silvestres exclusivamente, mientras que el segundo clado incluyó a las especies domesticadas de *Phaseolus* (Freytag & Debouck, 2002; Delgado-Salinas *et al.*, 2006; Debouck, 2021) se observa una distribución parcialmente diferenciada entre clados de las especies de acuerdo con su adaptación climática, tanto a climas semicálidos o templados de México (Cerdá-Hurtado *et al.*, 2018).

La especie *P. rotundatus*, endémica del occidente de México, se considera en peligro de extinción y las pocas poblaciones conocidas a la fecha se localizan en áreas naturales no protegidas como Tepatitlán de Morelos, Jalisco (Salcedo *et al.*, 2009). La colecta de los especímenes de esta y otras especies fue difícil debido principalmente a la expansión creciente de los asentamientos humanos y la consiguiente afectación de los hábitats naturales de las especies silvestres de *Phaseolus* (Acosta-Díaz *et al.*, 2015; Baez-González *et al.*, 2019). Las especies de *Phaseolus* agrupadas en el segundo clado de los árboles filogenéticos corresponden, en general, a sitios geográficos de recolección ubicados hacia el Este de México.

La especie *P. albiviolaecus* aparece en el grupo Tuerckheimii y no en Pedicellatus, como se diagnosticó morfológicamente (Freytag & Debouck, 2002). En este estudio se ubica a *P. glabellus* Piper en el clado Incerta Sedis, lo mismo que Delgado-Salinas *et al.* (2006) y fuera de la sección *Coccinei* (Freytag & Debouck, 2002) fuera del grupo Pedicellatus, en donde alguna vez se incluyó con base en su morfología por Delgado-Salinas *et al.* (1999).

El clado ancestral de las especies de *Phaseolus* estudiadas mostró una edad de 4.95 M.a. y la diversificación de los dos clados principales exhibió edad similar (3.8 M.a.), la edad menor (0.31 M.a.) se observó en el ancestro en común de *P. rotundatus* y *P. maculatifolius*. El subclado 2a (*P. pluriflorus*, *P. esperanzae*, *P. pedicellatus*) tuvo una edad de 2.39 M.a. y el subclado 2b (*P. microcarpus*, *P. glabellus*, *P. oligospermus*, *P. gladiolatus*, *P. zimapanensis* y *P. albiviolaecus*) tiene 2.87 M.a. El subclado 3a (*P. filiformis*, *P. acutifolius*, *P. coccineus striatus*, *P. coccineus griseus* y *P. vulgaris*) muestra una edad de 3.26 M.a. y el subclado 3b (*P. macvaughii*, *P. leptostachyus*, *P. lunatus*, *P. maculatus*, *P. maculatifolius* y *P. rotundatus*) tiene 2.68 M.a. Las edades aquí calculadas son similares a las descritas previamente (Delgado-Salinas *et al.*, 2006). Respecto a las especies no estudiadas antes, se determinó que la divergencia entre *P. albiviolaecus* y *P. zimapanensis* fue de 0.07 M.a.; mientras que entre *P. rotundatus* y *P. maculatifolius* fue de 0.31 M.a.

Estudios a futuro deben contemplar las especies ya conocidas y las que se identifiquen como nuevas a partir de colectas recientes y amplias de germoplasma (Debouck, 2021), de modo que se puedan resolver las inconsistencias e incertidumbres con respecto a la clasificación filogenética de las especies del género *Phaseolus*, considerando las tasas evolutivas rápidas en el género (Delgado-Salinas *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

El género *Phaseolus* es un grupo monofilético que se subdivide en dos linajes principales: uno incluye *P. pluriflorus*, *P. esperanzae*, *P. pedicellatus*, *P. microcarpus*, *P. glabellus*, *P. oligospermus*, *P. gladiolatus*, *P. zimapanensis* y *P. albiviolaecus*; y otro a *P. filiformis*, *P. acutifolius*, *P. vulgaris*, *P. coccineus striatus*, *P. coccineus griseus*, *P. macvaughii*, *P. leptostachyus*, *P. lunatus*, *P. maculatus*, *P. maculatifolius* y *P. rotundatus*.

La topología de los subclados distales en las filogenias reconstruidas con tres estuvo de acuerdo, en general, con la topología para *Phaseolus* de Delgado-Salinas *et al.* (2006). De las especies no estudiadas previamente se observó que *P. albiviolaecus*, según su morfología, pertenece al grupo *Pedicellatus* pero aquí se ubicó en el grupo *Tuerckheimii*, mientras que *P. maculatifolius* y *P. rotundatus* se incluyeron en el grupo *Polystachios*.

El clado ancestral de las especies de *Phaseolus* mostró una edad de 4.95 M.a. y la diversificación de los dos clados principales exhibió edad similar (3.8 M.a.), La divergencia entre *P. albiviolaecus* y *P. zimapanensis* fue de 0.07 M.a. mientras que entre *P. rotundatus* y *P. maculatifolius* fue de 0.31 M.a.

LITERATURA CITADA

- Acosta-Díaz, E., Hernández-Torres, I., Amador-Ramírez, M. D., Padilla-Ramírez, J. S., Zavala-García, F., & Baez-González, A. D. (2015). Collection and characterization of wild species of *Phaseolus* (Fabaceae) in northeastern Mexico for *ex situ* conservation. *Plant Ecology and Evolution*, 148(1), 119–127. <https://doi.org/10.5091/plecevo.2015.1009>
- Acosta-Gallegos, J. A., Kelly, J. D., & Gepts, P. (2007). Prebreeding in Common Bean and Use of Genetic Diversity from Wild Germplasm. *Crop Science*, 47, S-44-S-59. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.04.0008IPBS>
- Akaike, H. (1998). *Information Theory and an Extension of the Maximum Likelihood Principle* (pp. 199–213). https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1694-0_15
- Alva-Valdivia, L. M., Goguitchaichvili, A., Ferrari, L., Rosas-Elguera, J., Urrutia-Fucugauchi, J., & Zamorano-Orozco, J. J. (2000). Paleomagnetic data from the Trans-Mexican Volcanic Belt: implications for tectonics and volcanic stratigraphy. *Earth, Planets and Space*, 52(7), 467–478. <https://doi.org/10.1186/BF03351651>
- Baez-González, A. D., Acosta-Díaz, E., Padilla-Ramírez, J. S., Almeйда-León, I. H., & Zavala-García, F. (2019). Conservation status of eleven wild bean (*Phaseolus* spp. Fabaceae) species in northeastern Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(2), 417–429. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i2.1475>
- Cerda-Hurtado, I. M., Mayek-Pérez, N., Hernández-Delgado, S., Muruaga-Martínez, J. S., Reyes-Lara, M. A., Reyes-Valdés, M. H., & González-Prieto, J. M. (2018). Climatic adaptation and ecological descriptors of wild beans from Mexico. *Ecology and Evolution*, 8(13), 6492–6504. <https://doi.org/10.1002/ece3.4106>
- Chacón S., M. I., Pickersgill, B., Debouck, D. G., & Arias, J. S. (2007). Phylogeographic analysis of the chloroplast DNA variation in wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Americas. *Plant Systematics and Evolution*, 266(3–4), 175–195. <https://doi.org/10.1007/s00606-007-0536-z>
- Cota-Sánchez, J. H., Remarchuk, K., & Ubayasena, K. (2006). Ready-to-use DNA extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissue. *Plant Molecular Biology Reporter*, 24(2), 161–167. <https://doi.org/10.1007/BF02914055>
- Debouck, D. G. (2021). *Phaseolus* beans (Leguminosae, Phaseoleae): a checklist and notes on their taxonomy and ecology. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 15(1), 73–111. <https://doi.org/10.17348/jbrit.v15.i1.1052>

- Delgado-Salinas, A., Bibler, R., & Lavin, M. (2006). Phylogeny of the Genus *Phaseolus*; (Leguminosae): A Recent Diversification in an Ancient Landscape. *Systematic Botany*, 31(4), 779–791. <https://doi.org/10.1600/036364406779695960>
- Delgado-Salinas, A., Turley, T., Richman, A., & Lavin, M. (1999). Phylogenetic Analysis of the Cultivated and Wild Species of *Phaseolus* (Fabaceae). *Systematic Botany*, 24(3), 438. <https://doi.org/10.2307/2419699>
- Dohle, S., Berny Mier y Teran, J. C., Egan, A., Kisha, T., & Khoury, C. K. (2019). Wild Beans (*Phaseolus* L.) of North America. In *North American Crop Wild Relatives, Volume 2* (pp. 99–127). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-97121-6_4
- Drummond A J, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C, Field M, Heled J, Kearse M, Markowitz S, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer T, & Wilson A. (2011). *Geneious* (5.4). University of Auckland.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Felsenstein J. (1993). *Phylogeny Inference Package (PHYLIP)* (3.5). University of Washington.
- Freytag, G. F., & Debouck, D. G. (2002). *Taxonomy, distribution, and ecology of the genus Phaseolus (Leguminosae-Papilionoideae) in North America, Mexico and Central America*. BRIT. <https://hdl.handle.net/10568/54291>
- Gouy, M., Guindon, S., & Gascuel, O. (2010). SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2), 221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology*, 52(5), 696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>
- Guo, X., Castillo-Ramírez, S., González, V., Bustos, P., Luís Fernández-Vázquez, J., Santamaría, R., Arellano, J., Cevallos, M. A., & Dávila, G. (2007). Rapid evolutionary change of common bean (*Phaseolus vulgaris* L) plastome, and the genomic diversification of legume chloroplasts. *BMC Genomics*, 8(1), 228. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-228>
- Hernández-López, V. M., Vargas-Vázquez, Ma. L. P., Muruaga-Martínez, J. S., Hernández-Delgado, S., & Mayek-Pérez, N. (2013). Origen, domesticación y diversificación del frijol común. avances y perspectivas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(2), 95. <https://doi.org/10.35196/rfm.2013.2.95>
- Kupczok, A., Schmidt, H. A., & von Haeseler, A. (2010). Accuracy of phylogeny reconstruction methods combining overlapping gene data sets. *Algorithms for Molecular Biology*, 5(1), 37. <https://doi.org/10.1186/1748-7188-5-37>
- Lavin, M., Herendeen, P. S., & Wojciechowski, M. F. (2005). Evolutionary Rates Analysis of Leguminosae Implicates a Rapid Diversification of Lineages during the Tertiary. *Systematic Biology*, 54(4), 575–594. <https://doi.org/10.1080/10635150590947131>
- Lépiz-Ildefonso, R., López-Alcocer, J. J., Sánchez-González, J. J., Santacruz-Ruvalcaba, F., Nuño-Romero, R., & Rodríguez-Guzmán, E. (2010). Características morfológicas de formas cultivadas, silvestres e intermedias de frijol común de hábito trepador. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33(1), 21. <https://doi.org/10.35196/rfm.2010.1.21>
- López Soto J L, Ruiz-Corral J A, Sánchez-González J J, & Lépiz-Ildefonso R. (2005). Adaptación climática de 25 especies de frijol silvestre (*Phaseolus* spp.) en la República Mexicana. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28, 221–230.
- Meza-Vázquez, K. E., Lépiz-Ildefonso, R., López-Alcocer, J. de J., & Morales-Rivera, M. M. (2015). Caracterización morfológica y fenológica de especies silvestres de frijol (*Phaseolus*). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 38(1), 17. <https://doi.org/10.35196/rfm.2015.1.17>
- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1253–1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>

Recibido:
9/julio/2021

Aceptado:
12/enero/2022

- Ramírez-Villegas, J., Khoury, C., Jarvis, A., Debouck, D. G., & Guarino, L. (2010). A Gap Analysis Methodology for Collecting Crop Genebanks: A Case Study with Phaseolus Beans. *PLoS ONE*, 5(10), e13497. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013497>
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Salcedo J C, Lépiz R, Castañeda N A, Ocampo C, & Debouck D G. (2009). Additional observations about *Phaseolus rotundatus* (Fabaceae), an endemic bean species from western Mexico. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 3, 751–762.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Schwarz, G. (1978). Estimating the Dimension of a Model. *The Annals of Statistics*, 6(2). <https://doi.org/10.1214/aos/1176344136>
- Servin L E, & Márquez-Ortiz Y. (2007). A new phylogenetic analysis of *Phaseolus* species: patterns of diversification and biogeography. *Phaseomics*, 11.
- Smýkal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M. W., Berger, J., Greene, S. L., Nelson, M. N., Besharat, N., Vymyslický, T., Toker, C., Saxena, R. K., Roorkiwal, M., Pandey, M. K., Hu, J., Li, Y. H., Wang, L. X., Guo, Y., ... Varshney, R. K. (2015). Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1–3), 43–104. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897904>
- Tangphatsornruang, S., Sangsrakru, D., Chanprasert, J., Uthapaisanwong, P., Yoocha, T., Jomchai, N., & Tragoonrun, S. (2010). The Chloroplast Genome Sequence of Mungbean (*Vigna radiata*) Determined by High-throughput Pyrosequencing: Structural Organization and Phylogenetic Relationships. *DNA Research*, 17(1), 11–22. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsp025>