



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**  
**UNIDAD DE POSGRADO INVESTIGACIÓN Y**  
**DESARROLLO**  
**MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

**PROYECTO DE TESIS PRESENTADO COMO**  
**REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL GRADO**  
**ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**  
**MOLECULAR**

**“IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN**  
**ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO EN VARIEDADES**  
**COMERCIALES DEL FRÉJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris*) DE**  
**ECUADOR”**

**AUTORA: KARINA ALEXANDRA ORTEGA**  
**MALDONADO**

**GUAYAQUIL – ECUADOR**  
**JULIO 2016**

REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA		
FICHA DE REGISTRO DE TESIS		
TÍTULO Y SUBTÍTULO: "IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO EN VARIETADES COMERCIALES DEL FRÉJOL COMÚN ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) DE ECUADOR"		
AUTOR:  Blga. KARINA ALEXANDRA ORTEGA MALDONADO	TUTOR: Dra. Nardy del Valle Diez García PhD.	REVISORES: Ing. Sisiana Chávez Chica, Mg.
INSTITUCIÓN: UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL	FACULTAD: Unidad de Posgrado, Investigación y Desarrollo	
CARRERA: Maestría en Biotecnología Molecular		
FECHA DE PUBLICACIÓN: JULIO -2016	No. DE PÁGS: 71	
TÍTULO OBTENIDO: Bióloga		
ÁREAS TEMÁTICAS: (el área al que se refiere el trabajo. Ej. Auditoría Financiera, Auditoría, Finanzas)PROTEOMICA VEGETAL		
<b>Palabras claves:</b> <i>Phaseolus vulgaris</i> , estrés biótico, estrés abiótico, proteínas, SDS-PAGE		
<p>El fréjol común (<i>Phaseolus Vulgaris</i>) es la leguminosa mas importante en todo el mundo para el consumo humano directo. Es originaria de Meso América (México). En Ecuador es una de las principales fuente de proteínas y carbohidratos para la población urbana y rural, especialmente para las familias de escasos recursos económicos, que no pueden acceder a la proteína de origen animal.</p> <p>Factores de estrés biótico y abiótico, representan los principales obstáculos que limitan la producción agrícola. Los principales problemas bióticos son las enfermedades causadas por hongos y bacterias, mientras que el principal problema abiótico identificado en Ecuador es la falta de agua o sequía. Las proteínas desempeñan un papel muy importante en la respuesta de las plantas al estrés ya que están directamente implicados en la formación del fenotipo final.</p> <p>En este trabajo hemos llevado a cabo la identificación de la diversidad de proteínas en frijol común, basada en estudios proteómicos que se centraron en la respuesta al estrés biótico y abiótico de las variedades seleccionadas.</p> <p>La necesidad de estudiar conjuntamente la presencia de las proteínas en la semilla y luego lograr identificarlas de tal manera que se pueda relacionar con la presencia de las proteínas comunes <math>\alpha</math>-Amylase inhibitor <math>\beta</math> subunit, Phytohemaglutinin, Lectin. Y Phaseolin, las que están involucradas en la defensa (proteína PR) y las de respuesta al estrés (hifrofilinas, proteínas LEA, proteínas HSP, Execute 1 y 2, GCH, etc.) y de esta manera poder escoger variedades de <i>P. vulgaris</i> que puedan ser utilizadas en programas de mejoramiento genético.</p> <p>Luego de escoger las variedades de fréjol común, se siguió el protocolo de Bollini y col (1999) usando el Borato de Sodio como buffer para la extracción de proteínas del endospermo, se realizó electroforesis unidimensional a 9 variedades de <i>P. vulgaris</i> permitiendo confirmar la presencia de proteínas. Para la cuantificación de la proteína de los extractos se utilizó el método de Bradford, seguido de un enfoque isoeléctrico en tiras de 7 cm pH NL 3-10, en condiciones para la separación, que se basa en el desplazamiento de las moléculas en un gradiente de pH, en la segunda dimensión SDS-PAGE al 10%, se separaron y estudiaron las proteínas presentes en el endospermo de las semillas, obtenidas a partir de harinas de los granos. Y finalmente teñidos en comassie blue.</p> <p>La comparación de imágenes se lleva a cabo mediante software especializado, relacionando los resultados de este trabajo con el análisis de los geles, se identificará las variedades de <i>P. vulgaris</i> que presentan proteínas comunes y las relacionadas con el estrés biótico y abiótico. Variedades como INIAP 473 Boliche, INIAP 474 Doralisa, INIAP 482 Afroandino Y FRÉJOL DURO BLANCO se identificaron proteínas relacionadas al estrés como son las defensinas y las HSP10, mientras que en las otras variedades se identificaron mayormente las proteínas comunes: faseolinas y lectinas</p> <p>La calidad del análisis 2-DE se demostró con la selección de 40 puntos del gel para la identificación de proteínas y como patrón para el análisis de proteómica comparativa.</p>		
No. DE REGISTRO (en base de datos):	No. DE CLASIFICACIÓN:	
DIRECCIÓN URL (tesis en la web):		
ADJUNTO PDF:	<input checked="" type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
CONTACTO CON AUTOR/ES	Teléfono: 0980880475	E-mail:kari_ort@hotmail.com
CONTACTO EN LA INSTITUCIÓN:	Nombre: Unidad de Posgrado Investigación y Desarrollo	
	Teléfono: 2325530-38 Ext. 114	
	E-mail: upid@ug.edu.ec	

## CERTIFICADO DEL TUTOR

En mi calidad de tutora del Programa de Maestría en **BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**, nombrado por el Director General de la Unidad de Posgrado, Investigación y Desarrollo, CERTIFICO: que he analizado la Tesis presentada, como requisito para optar el grado académico de Magíster en **BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR** TITULADA: **IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO EN VARIEDADES COMERCIALES DEL FRÉJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris*) DE ECUADOR**, la cual cumple con los requisitos académicos, científicos y formales que demanda el reglamento de posgrado.



Atentamente.  
Dra. Nardy del Valle Diez García PhD.  
Pasaporte: 045654862  
[nardydiez@gmail.com](mailto:nardydiez@gmail.com)

## CERTIFICACIÓN DE REDACCIÓN Y ESTILO

(Nombre del gramatólogo) Título profesional, con registro del SENESCYT xxxxxxxxxxxx, por medio del presente tengo a bien **CERTIFICAR**: Que he revisado la redacción, estilo y ortografía de la tesis de grado, elaborada por la Señora **KARINA ALEXANDRA ORTEGA MALDONADO**, con C.I. **0918822008**, previo a la obtención del título de MAGISTER EN **BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**, Tema de tesis: **IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO EN VARIEDADES COMERCIALES DEL FRÉJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris*) DE ECUADOR**

Trabajo de investigación que ha sido escrito de acuerdo a las normas ortográficas y de sintaxis vigentes.

-----  
Nombre

N° Cédula

Registro SENESCYT

Número de teléfono

Correo

## DECLARACIÓN JURADA DEL AUTOR

Yo, **KARINA ALEXANDRA ORTEGA MALDONADO**, declaro bajo juramento ante la Dirección de Posgrado de la Universidad de Guayaquil, que el trabajo aquí descrito, así como sus resultados, conclusiones y recomendaciones presentadas es de mi autoría y exclusiva responsabilidad, que es inédita y no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional.

La reproducción total o parcial de esta tesis en forma idéntica o modificada, no autorizada por los editores transgrede los derechos de autoría. Cualquier utilización debe ser previamente solicitada a la Universidad de Guayaquil, a través de la Dirección de Posgrado o al autor.

Atentamente  
Blga. Karina A. Ortega Maldonado  
C.I. 0918822008  
[kari\\_ort@hotmail.com](mailto:kari_ort@hotmail.com)  
Teléfono: 0980880475

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecer primero a Dios por darme salud, fuerza y guiarme por el mejor camino para poder culminar con éxito mis estudios.

A mi directora de tesis, la Dra. Nardy Diez García por todo su apoyo, asesoría y permitirme formar parte de su grupo de trabajo.

A la Dra. Daynet Sosa del Castillo Directora del CIBE, por aceptarme en el laboratorio y brindarme toda la facilidad para que la tesis fuera desarrollada sin contratiempos.

A Jeffrey Vargas, por su interés, contribución con el estudio del frijol y por todo su apoyo.

Para María Alejandra por su valiosa colaboración con el análisis de los resultados.

A todos quienes colaboraron con su asesoría.

Para Mi Familia: Mis padres: Luis e Hilda, mis hermanos: Jimmy, Jenny, Lourdes y Geovanny, mi esposo: Fausto, mis hijos: Cristopher, Jeremy y Camila por ser parte de mi vida, mi soporte y la razón de levantarme cada día y seguir adelante.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a Dios que me ha dado la fortaleza para continuar.

A mis padres por todo su amor incondicional, su esfuerzo, su confianza, y estar presentes en todos los momentos de mi vida.

A mis hermanos y hermanas que siempre están brindándome su apoyo.

A una persona muy especial que aunque ahora ya no está aquí, sé que desde el cielo ha estado siempre cuidándome y apoyándome,

A mi esposo por permitirme culminar mi maestría, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre ha estado ahí brindándome su comprensión, cariño y amor.

A mis tres hijos mi principal fuente de motivación para superarme cada día más.

Y para todas aquellas personas que de una u otra manera han contribuido para el logro de este objetivo.

# ÍNDICE GENERAL

CERTIFICACIÓN DE REDACCIÓN Y ESTILO.....	III
DECLARACIÓN JURADA DEL AUTOR .....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
DEDICATORIA .....	VI
ÍNDICE GENERAL.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS .....	IX
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES. ....	X
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT .....	XV
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I: FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....	6
1.1 ANTECEDENTES .....	6
1.2 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	7
1.3 JUSTIFICACIÓN.....	8
1.4 OBJETIVOS .....	8
1.4.1 GENERAL.....	8
1.4.2 ESPECÍFICO.....	9
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO .....	10
2.1 GENERALIDADES DEL FRÉJOL .....	10
2.1.1 ORIGEN Y SUPERFICIE SEMBRADA.....	10
2.1.2 CULTIVO.....	13
2.1.3 CALIDAD NUTRICIONAL.....	14
2.1.4 TIPOS DE ESTRÉS EN LAS PLANTAS .....	15
2.1.5 IMPORTANCIA ECONÓMICA A NIVEL MUNDIAL: PRODUCCIÓN .....	22
2.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS VARIEDADES SELECCIONADAS.....	23
2.3 SITUACIÓN DEL FRÉJOL EN EL ECUADOR.....	26
2.3.1 PRODUCCIÓN Y CONSUMO .....	26
2.3.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA EN EL ECUADOR.....	28
2.4 PROTEÍNAS QUE SE EXPRESAN EN LAS PLANTAS ANTE EL ESTRES .....	29

2.4.1	PROTEÍNAS COMUNES EL FRÉJOL.....	32
2.5	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	32
2.5.1	CUANTIFICACIÓN POR EL MÉTODO DE BRADFORD.....	33
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS .....		34
3.1	MATERIALES.....	34
3.1.1	INSTITUCIÓN: LABORATORIO.....	34
3.1.2	MATERIALES DE OFICINA Y DE CAMPO .....	34
3.1.3	UNIVERSO Y MUESTRA .....	35
3.2	PROTEÓMICA COMPARATIVA .....	36
3.2.1	PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL .....	36
3.2.2	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DEL ENDOSPERMO .....	36
3.2.3	VERIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS PRESENTE EN LOS EXTRACTOS. ....	36
3.2.4	VISUALIZACIÓN DE PROTEÍNAS. TINCIÓN.....	42
3.2.5	ANÁLISIS DE LOS PATRONES ELECTROFORÉTICOS.....	43
CAPÍTULO IV: RESULTADOS.....		44
CONCLUSIONES.....		56
RECOMENDACIONES.....		57
BIBLIOGRAFÍA.....		58
ANEXOS.....		66

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Superficie, producción y ventas, según región y provincia. Fréjol seco, 2015 (Censos, s. f.).....	12
Tabla 2: Composición de nutrientes por cada 100 gramos de fréjol (Emilio Rodrigo Basantes Morales, 2015).....	15
Tabla 3: Características agronómicas y morfológicas de las variedades de <i>P. vulgaris</i> seleccionadas para el estudio.....	25
Tabla 4: Superficie, Producción y Rendimientos de frejol seco. ....	28
Tabla 5: Soluciones para la preparación de los geles de poliacrilamida en sus respectivos porcentajes .....	39
Tabla 6: Cantidad ( $\mu$ l) de extractos de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de <i>P. vulgaris</i> para la electroforesis 1D. ....	45
Tabla 7: Cantidad ( $\mu$ l) de extractos de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de <i>P. vulgaris</i> para la electroforesis 1D .....	46

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.

<b>Ilustración 1:</b> Porcentaje de superficie sembrada y producción, según región y provincia, INEC, 2015 (Censos, s. f.).	11
<b>Ilustración 2:</b> Principales países productores del fréjol	22
<b>Ilustración 3:</b> Variedades de <i>P. vulgaris</i> seleccionadas	24
<b>Ilustración 4:</b> Producción nacional del fréjol tierno y seco desde el año 2000 al 2014.	27
<b>Ilustración 5:</b> Importaciones nacionales de fréjol seco para el año 2014.	28
<b>Ilustración 6:</b> Exportaciones nacionales de fréjol tierno y seco durante el año 2014.	29
<b>Ilustración 7:</b> Electroforesis unidimensional de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de <i>P. vulgaris</i> ; MM; marcador molecular, carril 1: INIAP 474 Doralisa, carril 2: INIAP 473 Boliche, carril 3: INIAP 482 Afroandino, carril 4: TM-277. Las flechas rojas indican diferencias entre los genotipos (3 y 2 bandas)	44
<b>Ilustración 8:</b> Electroforesis unidimensional de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de <i>P. vulgaris</i> ; MM: marcador molecular, carril 1: SUG-8, carril 2: REM-5, carril 3: FOT-61, carril 4: ICTAJU, carril 5: DURO BLANCO.	45
<b>Ilustración 9:</b> Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de <i>P. vulgaris</i> ; variedad INIAP - 482. En la parte superior se muestra la escala de pI y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en kDa). El recuadro rojo indica la región del gel correspondiente a	

las faseolinas, el recuadro amarillo a la región de las arcelinas, el recuadro azul a la región correspondiente a los inhibidores de alfa amilasa, el recuadro amarillo a la región de las HSP10 y el recuadro verde a la región de las defensinas. .. 47

**Ilustración 10:** Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad INIAP - 482. En la parte superior se muestra la escala de pI y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en kDa). 12 µl de proteínas fueron aplicadas en tiras de 7 cm de rango de pH 3-10. .... 48

**Ilustración 11:** Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad INIAP – 473 Boliche. En la parte superior se muestra la escala de pI y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en kDa). 25 µl de proteínas fueron aplicadas en tiras de 7 cm de rango de pH 3-10. .... 49

**Ilustración 12:** Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad INIAP - 474. En la parte superior se muestra la escala de pI y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en kDa). 25 µl de proteínas fueron aplicadas en tiras de 7 cm de rango de pH 3-10. .... 49

**Ilustración 13:** Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad TM - 277. En la parte superior se muestra la escala de pI y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en kDa). 10 µl de proteínas fueron aplicadas en tiras de 7 cm de rango de pH 3-10. .... 50

**Ilustración 14:** Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad SUG – 8. En la parte superior se muestra la escala de pI y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en kDa). 10 µl de proteínas fueron aplicadas en tiras de 7 cm de rango de pH 3-10. .... 51

**Ilustración 15:** Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad REM - 5. En la parte superior se muestra la escala de pI y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en kDa). 15 µl de proteínas fueron aplicadas en tiras de 7 cm de rango de pH 3-10. .... 52

**Ilustración 16:** Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad FOT-61. En la parte superior se muestra la escala de pI y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en kDa). 10 µl de proteínas fueron aplicadas en tiras de 7 cm de rango de pH 3-10. .... 53

## RESUMEN

El fréjol común (*Phaseolus Vulgaris*) es la leguminosa mas importante en todo el mundo para el consumo humano directo. Es originaria de Meso América (México). En Ecuador es una de las principales fuente de proteínas y carbohidratos para la población urbana y rural, especialmente para las familias de escasos recursos económicos, que no pueden acceder a la proteína de origen animal.

Factores de estrés biótico y abiótico, representan los principales obstáculos que limitan la producción agrícola. Los principales problemas bióticos son las enfermedades causadas por hongos y bacterias, mientras que el principal problema abiótico identificado en Ecuador es la falta de agua o sequía. Las proteínas desempeñan un papel muy importante en la respuesta de las plantas al estrés ya que están directamente implicados en la formación del fenotipo final.

En este trabajo hemos llevado a cabo la identificación de la diversidad de proteínas en frijol común, basada en estudios proteómicos que se centraron en la respuesta al estrés biótico y abiótico de las variedades seleccionadas.

La necesidad de estudiar conjuntamente la presencia de las proteínas en la semilla y luego lograr identificarlas de tal manera que se pueda relacionar con la presencia de las proteínas comunes  $\alpha$ -Amylase inhibitor  $\beta$  subunit, Phytohemagglutinin, Lectin. Y Phaseolin, las que están involucradas en la defensa (proteína PR) y las de respuesta al estrés (hifrofilinas, proteínas LEA, proteínas HSP, Execute 1 y 2, GCH, etc.) y de esta manera poder escoger variedades de *P.vulgaris* que puedan ser utilizadas en programas de mejoramiento genético.

Luego de escoger las variedades de fréjol común, se siguió el protocolo de Bollini y col (1999) usando el Borato de Sodio como buffer para la extracción de proteínas del endospermo, se realizó electroforesis unidimensional a 9 variedades de *P. vulgaris* permitiendo confirmar la presencia de proteínas. Para la cuantificación de la proteína de los extractos se utilizó el método de Bradford, seguido de un enfoque isoelectrico en tiras de 7 cm pH NL 3-10, en

condiciones para la separación, que se basa en el desplazamiento de las moléculas en un gradiente de pH, en la segunda dimensión SDS-PAGE al 10%, se separaron y estudiaron las proteínas presentes en el endospermo de las semillas, obtenidas a partir de harinas de los granos. Y finalmente teñidos en comassie blue.

La comparación de imágenes se lleva a cabo mediante software especializado, relacionando los resultados de este trabajo con el análisis de los geles, se identificará las variedades de *P. vulgaris* que presentan proteínas comunes y las relacionadas con el estrés biótico y abiótico. Variedades como INIAP 473 Boliche, INIAP 474 Doralisa, INIAP 482 Afroandino Y FRÉJOL DURO BLANCO se identificaron proteínas relacionadas al estrés como son las defensinas y las HSP10, mientras que en las otras variedades se identificaron mayormente las proteínas comunes: faseolinas y lectinas

La calidad del análisis 2-DE se demostró con la selección de 40 puntos del gel para la identificación de proteínas y como patrón para el análisis de proteómica comparativa.

**Palabras claves:** *Phaseolus vulgaris*, estrés biótico, estrés abiótico, proteínas, SDS-PAGE

## ABSTRACT

The common bean (*Phaseolus vulgaris*) is the most important legume worldwide for direct human consumption. It is native to Mesoamerica (Mexico). In Ecuador is a major source of protein and carbohydrates for urban and rural population, especially for low-income families who cannot access the animal protein.

Factors biotic and abiotic stresses represent major obstacles that limit agricultural production. The main problems are biotic diseases caused by fungi and bacteria, while the main abiotic problem identified in Ecuador is the lack of water or drought. Proteins play a very important role in the response of plants to stress since they are directly involved in the formation of the final phenotype.

In this work we have carried out the identification of protein diversity in common bean, based on proteomic studies that focused on the response to biotic and abiotic stress of selected varieties.

The need to jointly study the presence of proteins in the seed and then achieve identify them so that you can relate to the presence of common proteins  $\alpha$ -Amylase inhibitor  $\beta$  subunit, Phytohemagglutinin, Lectin And Phaseolin, which are involved in the defense (PR protein) and stress response (hifrofilinas, LEA proteins, proline, HSP protein, Execute 1 and 2, GCH, etc.) and thus *P.vulgaris* to choose varieties that can be used in programs genetic improvement

After choosing the varieties of common bean, protocol Bollini et al (1999) was followed using sodium borate as a buffer for protein extraction endosperm; dimensional electrophoresis was performed to 9 varieties of *P. vulgaris* possible to confirm the presence protein. Bradford method was used for quantification of the protein extracts, followed by isoelectric focusing in strips 7 cm pH 3-10 NL under conditions for separation, which is based on the movement of molecules in a pH gradient in the second dimension SDS-PAGE 10%, separated and they studied the proteins present in the endosperm of seeds obtained from flour of grains. And finally coomassie blue stained.

The image comparison is performed using specialized software, linking the results of this work with the analysis of the gels, varieties of *P. vulgaris* with

common proteins and related to biotic and abiotic stress will be identified. Varieties such as INIAP 473 Boliche, INIAP 474 Doralisa, INIAP 482 Afroandino and beans HARD WHITE, related proteins were identified stress such as defensins and HSP10, while in other varieties common mostly proteins identified: phaseolins and lectins.

Quality 2-DE analysis was demonstrated by the selection of the gel 40 points for the identification of proteins and as a standard for analysis of comparative proteomics.

**Keywords:** Phaseolus vulgaris, biotic stress, abiotic stress, proteins, SDS-PAGE

## INTRODUCCIÓN

Las leguminosas figuran entre los primeros productos alimenticios que fueron cultivados por el hombre, es nativo de América, principalmente de México. Son plantas que pertenecen a la Familia Fabaceae, que se distinguen por producir frutos tipo vainas que contienen semillas en su interior. Representan una vasta familia de plantas, incluyendo más de 600 géneros y más de 13.000 especies. Son una importante fuente de proteína, vitaminas y minerales.

Durante el desarrollo de la semilla en los frijoles y varias legumbres se acumulan grandes cantidades de proteínas. Generalmente, la mayoría de frejoles secos contienen 15 a 25% de proteína sobre una base de peso en seco («Proteomic Analysis of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry - ProQuest», s. f.).

En Ecuador el frejol se cultiva tanto en la costa como en la sierra, pero es en esta última región donde reviste mayor importancia, pues allí esta cerca del 90% del área cultivada del país. Aproximadamente el 50% del área sembrada con fréjol en la sierra se la realiza asociada al maíz, por lo que podemos decir que en Ecuador las variedades de hábito trepador son tan importantes como las arbustivas. En Ecuador la preferencia es por los colores claros (amarillo, blanco, crema), pero las probabilidades de exportación a Colombia a hecho que los frejoles rojos y rojos moteados vayan tomando importancia, llegando hasta ocupar un espacio en el mercado local, bajo la forma de consumo de grano tierno (*Mejoramiento genético del frijol (Phaseolus vulgaris L.)*, 2000).

Las semillas esta compuesta de una cubierta protectora, una pequeña planta embrionaria, y un órgano de nutrientes de almacenamiento. Las semillas son abundantes en proteínas, y han sido objeto de muchos análisis. La relación entre la dieta humana y la concentración de proteína de la semilla ha movido a los primeros estudios en la proteómica de plantas.(Miernyk & Hajduch, 2011).

En la actualidad los esfuerzos por el mejoramiento del frejol se concentran en la identificación de marcadores genéticos para fenotipos de plantas importantes en la agricultura, incluyendo el rendimiento y la resistencia al estrés abiótico y

biótico (Robison, Heuberger, Brick, & Prenni, 2015). Dado que las proteínas están directamente involucradas en la respuesta al estrés de la planta, estudios de proteómica pueden contribuir significativamente a interpretar las posibles relaciones entre la abundancia de proteínas y la aclimatación de las plantas al estrés (Kosová, Vítámvás, Prášil, & Renaut, 2011).

Factores de estrés abiótico limitan severamente el crecimiento de plantas y el desarrollo, así como el rendimiento del cultivo. Varios estudios ya han demostrado que los cambios en la expresión génica a nivel de transcripción a menudo no se corresponden con los cambios en el nivel de proteínas. Por lo tanto, la investigación de los cambios en el proteoma de la planta es muy importante ya que las proteínas, a diferencia de las transcripciones, son efectores directos de respuesta al estrés de la planta.

Es imprescindible la presencia de una serie de componentes que la planta sintetiza, como es el caso de las proteínas. Además han tenido que sufrir adaptaciones a estrés abiótico y elaborar estrategias hábiles para la defensa y hacer frente a las agresiones tanto de tipo biótico (insectos, hongos, virus), como de tipo abiótico (agua, calor, oxido nítrico). Las proteínas constituyen una de las principales fuentes de defensa, no sólo por su elevada especificidad y eficiencia, sino porque además algunas de ellas son altamente reguladoras, respondiendo su síntesis al ataque de los depredadores (insectos) o de los patógenos.

La proteómica es un área de investigación amplia, instrumento que ha avanzado rápidamente desde su origen hace casi veinte años. A medida que el campo de la proteómica madura se ha observado un creciente número de estudios muy especializados; Organismo específico, celular u orgánulos específicos (Miernyk & Hajdich, 2011).

(2D-PAGE) es una herramienta proteómica útil, en el que las proteínas se separan en función de su punto isoeléctrico (pI) en la primera dimensión, y, posteriormente, en función de su peso molecular (MW) en la segunda dimensión, que han sido ampliamente utilizados para estudiar el conjunto de proteínas expresadas en un organismo (o por una parte de él) («Proteomic

## Analysis of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry - ProQuest», s. f.)

Plantas sometidas a diferentes tipos de estrés, incluyen como respuesta alteración en la expresión de proteínas. Para determinar la presencia de estrés en la planta como parte de una respuesta molecular, se realiza electroforesis uni y bidimensional, como hipótesis de este trabajo determinar si hay la presencia de proteínas que indican que la planta fue sometida a algún tipo de estrés biótico o abiótico.

El objetivo de este trabajo es identificar las proteínas involucradas con la resistencia en el fréjol común (*Phaseolus vulgaris*) comercial seleccionado, en el que se aborda un enfoque de la proteómica comparativa de semillas, para identificar las proteínas que se expresan diferencialmente en el estrés biótico y abiótico, las proteínas se extrajeron del endospermo de la semilla de *P. vulgaris* con buffer borato de sodio 20mM pH9. Para comprobar la presencia de proteínas realizamos una electroforesis unidimensional.

Comprobada la presencia de las proteínas se separaron en la primera dimensión utilizando tiras con un intervalo de pH de 3-10 y luego identificados mediante gel de poliacrilamida bidimensional electroforesis (2-DE). Dentro de las variedades de frijol común (*P. vulgaris*) seleccionadas para este estudio tenemos: FOT-61, DURO BLANCO, INIAP-474, SUG-8, INIAP 473, ICTAJU, REM-5, INIAP 482 AFROANDINO, TM-277.

Con la finalidad de cumplir con el objetivo de estudio, el trabajo esta dividido en cuatro capítulos. En el primer capitulo describe los antecedentes en cuanto al origen del frejol común, las adaptaciones que ha tenido que sufrir por los diferentes cambios bióticos y ambientales, la importancia de realizar esta investigación y los objetivos secundarios planteados para cumplir con el trabajo. En el segundo se refiere a las generalidades del fréjol, en cuanto a su origen, distribución, calidad nutricional, la variedades de estudios seleccionadas, la importancia que tiene el fréjol común a nivel mundial y en nuestro país y por ultimo las proteínas que en se puede encontrar comúnmente en el fréjol y el método de cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

En el tercer capítulo se explica la metodología implementada para obtener y analizar la información y cumplir con el objetivo de este trabajo. Y por último en el capítulo cuatro se describe los resultados obtenidos en el análisis por medio de la electroforesis bidimensional (2-DE) y el análisis de software realizada a cada una de las variedades seleccionadas para este estudio.

En varias especies de plantas, luego de la infección con virus, los viroides, hongos o bacterias, o la exposición a cambios ambientales, el desarrollo de los síntomas es acompañado por la aparición de una o más nuevas proteínas. Las proteínas encontradas en la semilla de *P. vulgaris*, que provee todos los nutrientes para el desarrollo del embrión, también son importantes en la dieta humana. Se ha revelado diferencias en el contenido de proteínas en ciertas variedades, siendo esto un punto importante para establecer estudios experimentales que se puedan aplicar y de esta manera mejora la calidad del grano.

Una de las proteínas que representa el 90% de la proteína en la semilla es la **faseolina**, ha sido de gran importancia para establecer la relación entre los cultivos, su fondo genético original, y la reducción de la diversidad molecular específica a diferentes regiones (Castro-Guerrero, Isidra-Arellano, Mendoza-Cozatl, & Valdés-López, 2016).

Según Montoya *et al.*, las subunidades de faseolina tienen un peso molecular que varía desde 43,1kDa hasta 51,5 kDa y se puede dividir en tres tipos: Tendergreen faseolina (T) con tres subunidades visibles y Sanilac (S) e Inca (I) con dos subunidades visibles.

Otro grupo de proteínas presentes en la planta resultado de la exposición a algún tipo de estrés también encontramos la **prolina** como respuesta al estrés salino, **las proteínas LEA (Late embryogenesis abundant)** como resultado del estrés hídrico de las plantas, **las proteínas HSP** (proteínas de choque térmico) que se expresan en el momento que la planta es expuesta a un estrés por temperaturas extremas. Otro estrés al que es sometida la planta es a la luz (fotoinhibición), se expresan proteínas como el **Executer 1 y 2** de las que no se sabe mucho sobre su actividad y características específicas.

Otro grupo de proteínas son las **defensinas**, son pequeños péptidos ricos en cisteína, altamente estables, que constituyen una parte del sistema inmune innato dirigido principalmente contra patógenos fúngicos. Las actividades biológicas reportados para defensinas vegetales se encuentra la actividad antifúngica, actividad antibacteriana, actividad inhibidora de la proteínasa y la actividad inhibidora de la amilasa de insectos (Stotz, Thomson, & Wang, 2009).

La aparición de nuevas proteínas no es específica de patógeno y esta determinada mediante el tipo de reacción que presente la planta huésped, lo que indica que estas proteínas son de origen host. Dado que las proteínas se inducen en condiciones patológicas específicas, que se han nombrado **proteínas o RP relacionadas con la patogénesis**. A pesar de que los RP particularmente son evidentes cuando el o los agentes patógenos inducen necrosis hipersensible, esta no es un requisito previo para su aparición.

Otras proteínas comunes encontramos las lectinas e inhibidores de  $\alpha$ -amilasas, son las principales proteínas de reserva. La lectina más abundante es la fitohemaglutinina (PHA), son muy estables con un intervalo de pH muy amplio, su rol es el de proteger a las semillas de la depredación de insectos y animales.

de reserva inhibidor de amilasa ( $\alpha$ -Amylase inhibitor), son relativamente comunes, forma parte de la respuesta de las plantas a infecciones y el estrés

Phytohemagglutinin, Lectin.

## CAPÍTULO I: FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.

---

### 1.1 ANTECEDENTES.

El biólogo W. Heydecker dice: "la semilla es el principio y el fin, simboliza la multiplicación y la dispersión, la continuación y la innovación, la sobrevivencia, la renovación y el renacimiento".

El frejol (*Phaseolus vulgaris*), es originario del continente americano, en los años 7000 a. C. en México y Perú ya se lo cultivaba. Tuvo gran desarrollo en civilizaciones como Azteca, Inca y Maya. El cultivo del fréjol se considera uno de los más antiguos, fue domesticado en las Américas por los indígenas durante la época precolombina, siendo México el probable centro de su origen, o al menos, como el centro primario de diversificación. Algunos de los hallazgos arqueológicos sugieren que el frijol fue domesticado en diferentes regiones de las Américas, incluyendo Sudamérica, Argentina, México e indican que se conocía hace algunos 5000 años antes de Cristo. Cambios en el fenotipo de la planta de fréjol, que da como resultado de la domesticación incluyen, pero no limitan, hábito de crecimiento, tamaño de la semilla, la retención de la semilla, y la madurez (Mensack et al., 2010)

Cuando los conquistadores de la Península Ibérica llegaron al Nuevo Mundo, había diferentes variedades de frejoles. Cristóbal Colón les llamó *faxónes* y *favas* por su parecido a las habas del viejo mundo, los aztecas los llamaban *etl*, los mayas *búul* y *quinsoncho*, los incas *purutu*, los cumanaotos de Venezuela *caraoatas*, en el Caribe les denominaban *cunada*, los chibchas *jistle* o *hist* (Felix, 2011)

Las plantas tienen que hacer frente a diversos y complejos tipos de interacciones que implican numerosos factores ambientales. En el curso de la evolución, se han desarrollado mecanismos específicos que les permiten adaptarse y sobrevivir a los acontecimientos estresantes. La exposición de las plantas a estrés biótico y abiótico induce una interrupción en el metabolismo de la planta lo que implica costes fisiológicos, y por lo tanto conduce a una reducción en la aptitud y en última instancia de la productividad. El estrés

abiótico es una de las características más importantes del fréjol y tiene un enorme impacto en el crecimiento y, en consecuencia, es responsable de graves pérdidas en el campo. Las reducciones de crecimiento resultantes pueden llegar a > 50% en la mayoría de las especies de plantas. Por otra parte, el estrés biótico es un reto adicional que induce una fuerte presión sobre las plantas y la adición a los daños a través de patógenos o ataque de herbívoros (Rejeb, Pastor, & Mauch-Mani, 2014).

## 1.2 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

Desde tiempos remotos hasta la actualidad la humanidad depende mucho del consumo de las plantas, de ellas obtenemos diferentes productos para satisfacer varias necesidades como son alimento, vivienda, salud, etc. Las plantas tienen un notable valor ecológico ya que son la base fundamental de la cadena alimenticia.

Dentro de todas las variedades de plantas tenemos a las leguminosas, y para nuestro estudio nos centraremos en una especie que pertenece a la familia Fabaceae, el fréjol común (*P. vulgaris*), siendo su principal uso el consumo del grano o semilla. La importancia de esta especie dentro de la alimentación humana es el alto contenido de proteínas en su semilla. Este aporte de proteínas comparadas con las fuentes de origen animal, ha las que la gran mayoría de población no tiene acceso fácilmente debido a altos niveles de pobreza.

Conociendo la importancia de este recurso para la alimentación y la agricultura, se busca realizar el estudio proteómico de variedades de fréjol común (*P. vulgaris*) y así aportar con pruebas acerca de las proteínas que se expresan a cambios bióticos y abióticos y con programas de mejoramiento genético obtener y seleccionar de las variedad optimas.

De ahí la importancia de tener acceso a variedades que respondan a las necesidades locales, de seleccionar y producir materiales óptimos para los

agricultores y de esta forma apoyar al mejoramiento agroindustrial local y que puedan ofertar un producto de alta calidad y en condiciones adecuadas.

La razón a la que se debe una producción deficiente, o una producción de baja calidad, es decir el factor fundamental al que se debe el bajo rendimiento de los cultivos es el estrés vegetal. El manejo de los factores de estrés en los vegetales es de mucha importancia para poder elaborar modelos matemáticos de predicción de los cambios de la naturaleza (estudio de los efectos climáticos posibles), además se debe considerar el hecho que la interacción de las plantas con los factores ambientales es fundamental para comprender la distribución de las especies en los ecosistemas. Cabe indicar que además es preciso comprender los procesos fisiológicos inferiores en la pasividad de los cultivos al estrés a la hora de implantar programas de mejora genética, los mismos que pueden ser de orden tradicional como biotecnológicos.

### **1.3 JUSTIFICACIÓN**

Siendo esta leguminosa considerada de gran importancia por tener un alto valor nutricional en las semillas en *Phaseolus vulgaris*, son en ocasiones blancos de ataques de distintos tipos de insectos. En el presente trabajo, mediante el uso de la proteómica se identificarán proteínas involucradas con los mecanismos de resistencia en el fréjol común *P. vulgaris*, crear una base de datos del proteoma de todos los materiales extraídos, y lograr identificar que proteínas están relacionadas con el estrés biótico y abiótico.

### **1.4 OBJETIVOS**

#### **1.4.1 GENERAL**

Identificar las proteínas involucradas con la resistencia en el fréjol común (*Phaseolus vulgaris*) comercial seleccionado.

## **1.4.2 ESPECÍFICO**

- Identificar y caracterizar las muestras de frejoles seleccionadas para la extracción de proteínas.
- Validar el método de extracción en las variedades de frejol que fueron seleccionadas.
- Obtener y comparar el proteoma de la semilla de fréjol de las variedades seleccionadas.
- Identificar y relacionar las proteínas expresadas al estrés biótico y abiótico con las variedades seleccionadas.

## **CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO**

### **2.1 GENERALIDADES DEL FRÉJOL**

Las leguminosas presentan alrededor de un 15 a 50 % de las proteínas de la dieta de los seres humanos en muchos países. El fréjol común (*Phaseolus vulgaris*), es una de las leguminosas en grano más consumidas en el mundo principalmente en América del Sur y África, tienen valiosas propiedades nutricionales por ser una importante fuente de fibra, minerales y vitaminas, así como a su bajo contenido de grasa y de sodio. («In-Depth Characterization of the Phaseolin Protein Diversity of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Based on Two-Dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometry», s. f.).

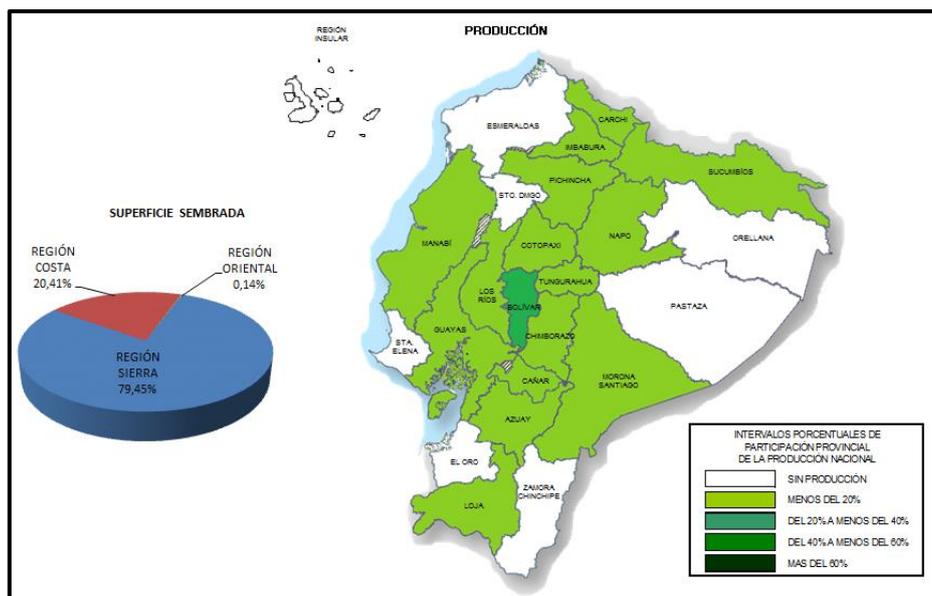
La proteína en semillas secas de fréjol común es rica en lisina, es también una fuente importante de hidratos de carbono complejos, fibra y minerales. El color, el tamaño, y la forma de semillas de fréjol varían considerablemente. Las proteínas de fréjol han sido asignadas a dos grupos, las globulinas de sales solubles y las albúminas solubles en agua que representan, para un máximo de 45 a 70% y de 10 a 30% de la proteína total, respectivamente. Albúminas de fréjol se componen típicamente de varias proteínas diferentes, incluyendo lectinas e inhibidores de enzimas que se consideran compuestos defensivos generales. («Proteomic Analysis of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry - ProQuest», s. f.).

#### **2.1.1 ORIGEN Y SUPERFICIE SEMBRADA**

El fréjol común tiene origen Mesoamericano y a partir de una reducción de la diversidad genética de la población en comparación con su ancestro, se formó el acervo Andino antes de la domesticación, y por migración llegó a Sudamérica. La discrepancia entre uno, dos o más orígenes se debe a que en unos trabajos previos los investigadores analizaron una faseolina tipo I y consideraron que las filogenias de especies y genes son idénticas. Información de aloenzimas, faseolinas, lectinas e inhibidores de  $\alpha$ -amilasa permite distinguir entre acervos Andino y Mesoamericano. El acervo Mesoamericano

presenta mayor diversidad tanto de aloenzimas como de ciertos tipos de faseolinas. Al contrario, el Andino muestra diversidad genética reducida (Hernández-López, Vargas-Vázquez, Muruaga-Martínez, Hernández-Delgado, & Mayek-Pérez, 2013).

En la Ilustración 1 y en la tabla 1 podemos observar la superficie sembrada a nivel nacional y cada uno de los porcentajes referidas a cada región, con lo que tendríamos una visión clara del aporte de cada una de las zonas productivas de frejol seco en el país.



**Ilustración 1: Porcentaje de superficie sembrada y producción, según región y provincia, INEC, 2015 (Censos, s. f.).**

REGIÓN Y PROVINCIA		SUPERFICIE (Has.)		PRODUCCIÓN (Tm.)	VENTAS (Tm.)
		Sembrada	Cosechada		
TOTAL NACIONAL		31.112	26.121	12.878	8.711
REGIÓN SIERRA		24.717	20.146	10.119	6.221
REGIÓN COSTA		6.351	5.958	2.751	2.489
REGIÓN ORIENTAL		44	18	8	.
ZONAS NO DELIMITADAS		.	.	.	.
<b>REGIÓN SIERRA</b>					
AZUAY	Solo	132	106	41	19
	Asociado	6.526	4.893	1.895	280
BOLÍVAR	Solo	3.382	3.177	2.102	1.953
	Asociado	1.232	635	648	593
CAÑAR	Solo	104	91	40	6
	Asociado	2.193	1.891	606	239
CARCHI	Solo	1.796	1.597	1.106	932
	Asociado	.	.	.	.
COTOPAXI	Solo	380	300	193	133
	Asociado	653	472	223	158
CHIMBORAZO	Solo	2.200	1.822	948	755
	Asociado	227	227	79	32
IMBABURA	Solo	1.054	1.005	756	668
	Asociado	2.019	1.658	690	263
LOJA	Solo	43	40	11	.
	Asociado	2.542	2.022	629	77
PICHINCHA	Solo	129	129	116	107
	Asociado	89	65	25	.
TUNGURAHUA	Solo	4	4	3	.
	Asociado	12	12	7	5
SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS	Solo	.	.	.	.
	Asociado	.	.	.	.
<b>REGIÓN COSTA</b>					
EL ORO	Solo	.	.	.	.
	Asociado	236	223	111	.
ESMERALDAS	Solo	.	.	.	.
	Asociado	.	.	.	.
GUAYAS	Solo	197	197	226	225
	Asociado	378	324	359	351
LOS RÍOS	Solo	1.065	1.011	554	548
	Asociado	3.945	3.724	1.310	1.290
MANABÍ	Solo	62	53	29	.
	Asociado	468	426	161	75
SANTA ELENA	Solo	.	.	.	.
	Asociado	.	.	.	.
<b>REGIÓN ORIENTAL</b>					
MORONA SANTIAGO	Solo	6	6	2	.
	Asociado	32	6	3	.
NAPO	Solo	1	1	0	.
	Asociado	.	.	.	.
ORELLANA	Solo	.	.	.	.
	Asociado	.	.	.	.
PASTAZA	Solo	.	.	.	.
	Asociado	.	.	.	.
SUCUMBÍOS	Solo	.	.	.	.
	Asociado	5	5	3	.
ZAMORA CHINCHIPE	Solo	.	.	.	.
	Asociado	.	.	.	.
ZONAS NO DELIMITADAS	Solo	.	.	.	.
	Asociado	.	.	.	.

Fuente: INEC 2015

**Tabla 1: Superficie, producción y ventas, según región y provincia. Fréjol seco, 2015 (Censos, s. f.)**

## 2.1.2 CULTIVO

Es un importante cultivo alimentario, se lo cultiva y se consume en todo el mundo. Es una especie de clima templado y por tanto, no crece bien en zonas frías o calientes. El umbral térmico de la especie es de 10° C como temperatura mínima y 25° C como temperatura máxima. Las heladas producen la muerte de las plantas, en tanto que el exceso de calor afecta a la floración y aumenta la esterilidad de las flores. Las características del ciclo vegetativo dependen de la acumulación de temperaturas. Los cultivares adaptados a las zonas más cálidas tienen un ciclo de alrededor de 90 días, mientras que los adecuados a zonas más frescas llegan a tenerlo hasta 250 días (Emma Torres Navarrete et al., 2013)

El fréjol en Ecuador tiene una excelente adaptación pero se produce en sectores con temperaturas promedios de 20 a 28°C y entre 00 a 1600 m.s.n.m., con un mínimo de 400 a 600 mm de lluvia, repartidos durante el desarrollo de la planta, remarcando la necesidad de agua que el promedio de formación de granos necesita hasta iniciar su maduración. El Litoral ecuatoriano ofrece las condiciones óptimas agroclimáticas, necesarias para el desarrollo de este cultivo, con un promedio de 21°C, este cultivo requiere temperaturas frescas para la fecundación de las flores. En general, el fréjol no soporta heladas ni temperaturas superiores a 35 grados Celsius.

Guamán y Andrade (2003) señalan que en el fréjol arbustivo, para obtener los mejores resultados, requiere de 400 a 500 mm de agua bien distribuida, aplicados por riego. El fréjol se desarrolla mejor en suelos con pH de 6.5 a 7.5, rango en el cual la mayoría de nutrientes de la planta se encuentran en su máximo grado de disponibilidad. El fréjol es una planta que se desarrolla en suelos de textura franca, bien drenados, con buena aireación y fertilidad, ricos en materia orgánica. Puede ser un monocultivo, o como especies primarias y secundarias en cultivos múltiples.

En el Ecuador el fréjol se puede cultivar en dos métodos: **asociado con maíz** (casi un 45%) y como **monocultivo**. El fréjol voluble asociado al maíz es un cultivo que predomina en la Sierra. En tanto que el fréjol arbustivo se rota con

maíz, hortalizas (arveja tierna, zanahoria, pimiento) en la Sierra o con fruta (sandía) en la Costa, es decir es más dinámico en el sistema (Emilio Rodrigo Basantes Morales, 2015)

Existen otras razones de importancia económica, ecológica y medica para este cultivo: **a)** importante en la canasta familiar por sus altos contenidos de proteína, carbohidratos y minerales, así como también de vitaminas, minerales y fibras solubles (pectinas). **b)** Nutre los suelos, incorporando el nitrógeno atmosférico fijado por simbiosis con bacterias del genero rhizobium. **c)** Algunas variedades son fácilmente adaptables en diferentes épocas del año lo que hace fácil su producción.

### 2.1.3 CALIDAD NUTRICIONAL

Debido a su valor nutritivo (Tabla 2), especialmente proteínas, carbohidratos, vitaminas y micronutrientes, frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) ha sido reconocido como un cultivo que podría garantizar la seguridad alimentaria (Namugwanya Margaret<sup>1,2</sup>, John Stephen Tenywa<sup>1</sup>, Erasmus Otabbong<sup>3</sup>, Drake N. Mubiru<sup>4</sup> & Twaha Ali & Basamba<sup>1</sup>, 2014). Dentro de los macronutrientes, la fracción de lípidos es la mas pequeña, y los componentes químicos de la fibra principales son pectinas, pentosanos, hemicelulosa, celulosa y lignina. Considera también una fuente de calcio, hierro, fósforo, magnesio y zinc y de las vitaminas tiamina, niacina y ácido fólico (Dr. José Armando Ulloa et al., 2011)

La característica nutricional más importante de las leguminosas es ser un producto suplementario sobre las dietas compuestas por cereales, pero dicha cualidad se limita por la insuficiencia de aminoácidos azufrados y por los llamados factores anti nutricionales. En consecuencia, estos factores limitantes son de importancia por su origen genético y por tanto, se consideran prioritarios en los diversos programas de mejoramiento genético. («Evaluación de la Calidad de la Proteína de 4 Variedades Mejoradas de Frijol», s. f.).

humedad	10-12 %	Fósforo	247 mg
Hidratos de C	58-60 %	Vitamina A	2 mg
Proteína	21-26 %	Vitamina B	0.57 mg
Grasa	1-2 %	Vitamina B2	0.17 mg
Fibra	3 %	Vitamina C	3 mg
Ceniza	3 – 3.5 %	Niacina	2.1 mg
Ca	86 mg	Hierro	7.6 mg

**Tabla 2: Composición de nutrientes por cada 100 gramos de fréjol (Emilio Rodrigo Basantes Morales, 2015).**

### 2.1.4 TIPOS DE ESTRÉS EN LAS PLANTAS

Lichtenthaler (1998) indicó que el estrés en los vegetales es “cualquier condición desfavorable para el crecimiento y desarrollo de los vegetales” y también subrayó que en la mayor parte de los casos “las plantas pueden recuperarse cuando desaparecen los agentes estresantes”.

El concepto de estrés en vegetales se extendió, diferenciando entre eu-estrés y dis-estrés, en el que el primero tiene carácter positivo, activador, mientras que el segundo es un estrés severo que causa daño (Alfonso de Cires Segura, 2009)

Los cultivos son susceptibles al estrés biótico y abiótico y dependiendo de la gravedad de la tensión y la capacidad de la planta para tolerarlos, el rendimiento podría verse afectada gravemente.

A lo largo de su ciclo vital, están expuestas a un gran número de condiciones o factores estresantes que pueden dividirse en:

- Estreses bióticos: Por la acción de seres vivos.
  - ❖ Grandes y pequeños animales
  - ❖ Otras plantas o insectos

- ❖ Bacterias, hongos y virus
- ❖ Nemátodos
- Estreses abióticos: Físicos y químicos.
  - ❖ Sequía (estrés hídrico)
  - ❖ Exceso de sales en el suelo (estrés salino)
  - ❖ Calor, frío y congelación (estrés por temperaturas extremas)
  - ❖ Luz
  - ❖ Encharcamiento e inundación (estrés por anaerobiosis)
  - ❖ Estrés por contaminantes medioambientales (CFC, ozono, herbicidas, metales...)
  - ❖ Deficiencia en elementos minerales (estrés nutricional)
  - ❖ Viento, suelo compacto (estrés mecánico)
  - ❖ Lesiones
  - ❖ Heridas

Los efectos negativos del estrés abiótico producen cambios en el metabolismo de las plantas, el crecimiento y el desarrollo, en casos extremos conducen a la muerte de la planta. Esta es una preocupación específica en la agricultura, donde los cambios relacionados con el estrés limitan la productividad y pueden conducir a la pérdida económica intolerable para los ganaderos. Por lo tanto, la comprensión de las respuestas al estrés es esencial en los intentos de criar cultivares resistentes que pueden soportar los estreses abióticos y alimentar a la creciente población. Muchos estudios recientes se centraron en los cambios del nivel del proteoma inducidos en las plantas cuando son expuestas a diferentes factores de estrés abiótico (Sha Valli Khan, Nagamallaiah, Dhanunjay Rao, Sergeant, & Hausman, 2014). El análisis del proteoma reciente realizado en el Reino vegetal ha proporcionado nuevas dimensiones

para evaluar los cambios en los tipos de proteínas y sus niveles de expresión bajo estrés abiótico (Timperio, Egidi, & Zolla, 2008).

Existen otros organismos en la comunidad vegetal: animales, hongos, bacterias y otros microorganismos. Cada especie no solamente interactúa con los factores abióticos sino que constantemente está interactuando con otras especies para conseguir alimento, u otros beneficios mientras que compite con otras. Las interacciones con otras especies se clasifican como **factores bióticos**; algunos son positivos, otros negativos y algunos son neutros.

A pesar de haber sido adaptada a las diversas condiciones ambientales, el fréjol común no está exento de limitaciones bióticas y abióticas. Sufre de seis principales enfermedades generalizadas y algunas condiciones abióticas hostiles (Hnatuszko-Konka, Kowalczyk, Gerszberg, Wiktorek-Smagur, & Kononowicz, 2014)

Estos avances que apoyen el desarrollo de las leguminosas mejor adaptadas a los cambios ambientales, enfrenta a las demandas en la actualidad en el campo de la agricultura y la alimentación, ensañados por los cambios climáticos globales.

#### **2.1.4.1 ESTRÉS ABIÓTICO DE LAS PLANTAS**

Condiciones ambientales son percibidas por distintos órganos de las plantas, dicha información se transmite mediante señales que activan respuestas de desarrollo y crecimiento vegetativo, estas respuestas van a depender de la duración y la severidad de las mismas y de los factores ambientales que lo provoquen. En dependencia de la intensidad de afectación de las condiciones ambientales, las respuestas al crecimiento se contienen y provocar mecanismos de protección y defensa que malogran el desarrollo y garantizan la supervivencia de la planta bajo estas condiciones ambientales desfavorables (Almudena Montoliu Vidal, 2010)

A lo largo del tiempo, las plantas han tenido que desarrollar diferentes respuestas y adaptaciones que les permiten sobrevivir bajo condiciones de

constante **estrés hídrico**. Estas adaptaciones están relacionadas con una capacidad mayor de tomar agua o con el uso más eficiente de este recurso.

Cuando lentamente se desarrolla el déficit hídrico, las plantas llegan a presentar respuestas de aclimatación que tienen efectos sobre el crecimiento, como la disminución de la expansión foliar y el aumento del crecimiento radicular. Entre las proteínas más importantes por su efecto protector potencial están las **LEA** (*Late Embriogenesis Abundant Proteins*) y las que funcionan como antioxidantes. Se ha propuesto que las proteínas LEA protegen proteínas y membranas del daño debido a la deshidratación (F, 2009).

La tolerancia a la sequía puede ser considerada como una deshidratación moderada, y la desecación generalmente se refiere a la tolerancia a una mayor deshidratación. Asimismo, la tolerancia a la desecación incluye la posibilidad de las células de rehidratarse exitosamente. Los mecanismos que confieren tolerancia a la sequía se basan principalmente en una estructura estable por hidratación preferencial, mientras que los mecanismos que otorgan tolerancia a la desecación están basados en el remplazo del agua por moléculas que forman puentes hidrógenos (Pereyra Cardozo M. 1,\* & A. Quiriban 1, 2014)

Los cambios significativos en el potencial de agua por incremento de la salinidad en el suelo, genera primeramente un **estrés osmótico** en las plantas, las cuales pueden interrumpir sus actividades celulares normales, o incluso causarles la muerte. Bajo condiciones naturales, las elevadas concentraciones de sales y la sequia constituyen las mayores causas del estrés osmótico para las plantas. El **estrés salino** afecta no solo a la homeostasis iónica en las células vegetales. Los excesos de iones de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> pueden provocar cambios conformacionales en las proteínas estructura y/o cambios en el potencial eléctrico de la membrana citoplasmática; mientras que el estrés osmótico provoca la pérdida de la turgencia y cambios en el volumen celular. Los cambios en la turgencia inducidos por el estrés osmótico y el exceso de iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> pueden actuar como señales de estrés salino.

La concentración elevada de iones como el citosol, pueden provocar cambios conformacionales en la estructura tridimensional de las moléculas que pueden llevar a la inactivación de las mismas. Una estrategia desarrollada por las

plantas para evitar que suceda este fenómeno y facilitar la absorción del agua y restaurar el estrés hiperosmótico; ha sido de interés la acumulación de compuesto osmóticamente activos llamados osmolitos biocompatibles. Un osmolito que ha recibido mucha atención es la **prolina**. La acumulación de prolina bajo diferentes condiciones de estrés abiótico ha sido reportada en muchas especies. El papel beneficioso de la prolina en el incremento de la tolerancia a estreses abióticos en las plantas ha sido demostrado en los últimos años («Fisio vegetal estres salino», 04:41:02 UTC)

**La temperatura** es una causa importante que regulariza la distribución y el comportamiento temporal de las plantas. Al ser sésiles, las plantas a mínimas diferencias de temperatura son muy delicadas a consecuencia de estos cambios ajustan su crecimiento y desarrollo. El conjunto de cambios morfológicos inducidos por altas temperaturas ambiente, por debajo del rango de estrés térmico, se denomina termomorfogénesis (Quint et al., 2016)

Factores de transcripción estrés por calor (HSFs), juegan un papel muy importante en la respuesta a las plantas de diferentes tipos de estrés abiótico mediante la expresión de genes de respuesta a estrés, como las proteínas de choque térmico (HSP) (Guo et al., 2016).

Las proteínas de choque térmico (HSP) cuya función es la de ser chaperonas moleculares son los elementos clave responsables de plegamiento de proteínas, montaje, translocación, y la degradación en condiciones de estrés y en muchos procesos celulares normales (Park & Seo, 2015).

**La luz** es esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, pero en alta intensidad, duración, dirección puede influir en todas las respuestas y llegar a ser nocivas. La fotoinhibición, definida como la inhibición de la fotosíntesis causada por el exceso de radiación, afecta la producción en condiciones de campo, en gran medida. Investigadores españoles y suecos han descubierto que una familia de proteínas controla la respuesta de las plantas a las variaciones de la intensidad de luz. Utilizando la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y sometiéndola a intensidades lumínicas diferentes, los investigadores han descubierto que un grupo de proteínas denominado Executer1 y Executer2 modifican la expresión de otras proteínas en el cloroplasto en función de los

cambios en la intensidad lumínica, aunque, aún falta por aclarar las funciones específicas de esta familia de proteínas (Uberegui, Hall, Lorenzo, Schroder, & Balsera, 2015).

**El estrés por inundación o encharcamiento** es un factor abiótico que disminuye la cantidad de oxígeno disponible (hipoxia) y bloquea la captación de energía lumínica en las hojas. La inundación de los campos de cultivo es el segundo estrés de mayor importancia que causa pérdidas agrícolas.

La célula vegetal limita su síntesis proteica en presencia de estrés por hipoxia, a excepción de un conjunto de enzimas y factores de transcripción llamados "péptidos anaeróbicos". Los péptidos anaeróbicos, ahora conocidos como *Genes Centrales de Hipoxia (GCH)*, son un conjunto de factores de transcripción, transductores, chaperonas, hemoglobinas, proteínas de identidad desconocida (50 % de los inducidos por el estrés) y enzimas del metabolismo fermentativo (Peña-Castro, 2014)

**Estrés por contaminantes ambientales**, el cultivo en suelo contaminado es una situación de estrés para las plantas y una de las consecuencias más comunes de estrés abiótico, presenta un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), debido a la reducción secuencial del O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. Las ROS son moléculas tóxicas que provocan la oxidación inespecífica de proteínas y lípidos de membrana e incluso están relacionadas con daños a nivel de ADN. Como consecuencia de esto, se produce un aumento de proteínas carboniladas, malondialdehído (MDA) y un incremento en la producción en etileno (Ester María Murube Torcida, 2014)

Los requerimientos nutricionales de las plantas son variados, lo que les permite vivir a condiciones adversas lo que provoca el **estrés nutricional** permitiendo su adaptación genética a su hábitat. Variedades de una misma especie pueden llegar a presentar diferencias en la absorción, translocación, acumulación y el uso de los nutrientes, características que pueden ser aprovechadas para el mejoramiento de las plantas. La absorción de nutrientes (carbono, nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, etc.) esta asociada por el agua, en donde se encuentran disueltas (Alfonso de Cires Segura, 2009).

La acción del viento y la presencia de suelos compactos pueden provocar el **estrés mecánico** de las plantas. Se ha observado que el viento disminuye la temperatura foliar lo que provoca disminución en la presión de vapor en la capa límite de la hoja, perjudicando su acción fotosintética. El efecto del viento está relacionado con la intensidad y duración por lo que los cultivos sufren de modo distinto el efecto del estrés mecánico, dependiendo su variabilidad y susceptibilidad. La acción del viento comienza en la semilla que son colocadas en la superficie o a poca profundidad, lo que causa retrasos en el crecimiento y desarrollo de la planta, lo que puede o no provocar lesiones, ejemplo rotura de ramas, flores o laceración de las hojas e incluso caídas del fruto fuera de tiempo perjudicando la calidad de la producción. («Los daños y el estrés mecánico del cultivo causados por el viento», 2015)

El estrés mecánico en las plantas produce daños en la superficie foliar, lo que ocasiona daño permanente en la hoja que se observa por medio de lesiones que toman colores marrón a lo que se conoce como el **estrés por lesiones o heridas**.

#### **2.1.4.2 ESTRÉS BIÓTICO DE LAS PLANTAS**

El estrés biótico es causado por la acción de otros seres vivos: **a) Bacterias, hongos, virus y nematodos**, como mecanismo de defensa utilizan la presión mecánica o secretan enzimas específicas para romper los tejidos de la planta. Aunque, gran parte de los patógenos atacan tejidos enfermos o que ya presentan daños. **b) Plantas**: Por la competencia de las plantas por un espacio y por los recursos necesarios para su desarrollo como son agua, luz y nutrientes, la habilidad que utiliza la planta para garantizar el acceso a los recursos con un crecimiento rápido y secreción de sustancias tóxicas para otras plantas. **c) Insectos**: que utilizan la planta como alimento, hay de dos clases, los chupadores que provocan daño directo y transmiten el virus y los masticadores que raramente transmiten el virus pero el tejido vegetal que totalmente afectado y comprometido para el ataque de hongos y bacterias. **d) Vertebrados**: grandes o pequeños, el efecto depende de la dimensión del daño, de la etapa

de desarrollo que se encuentra y de la respuesta que esta presente. Estos vertebrados intervienen como vectores de microorganismos (Almudena Montoliu Vidal, 2010)

## 2.1.5 IMPORTANCIA ECONÓMICA A NIVEL MUNDIAL: PRODUCCIÓN

Fréjol común (*Phaseolus vulgaris*) es una de las más importantes fuentes de proteínas para los seres humanos y el ganado. Esta leguminosa tiene historia fascinante de domesticación y diversificación y en la actualidad, es uno de los pilares fundamentales de la economía mundial. En el mundo se conocen alrededor de 150 especies de frejoles, de las cuales 50 se encuentran en México con gran diversidad de tamaños, colores y requerimientos ecológicos. Se conocen en México y América Latina, con los nombres de frijol, poroto, alubia, caraota y judía.

En el mundo los principales países productores de fréjol son la India, Brasil, Myanmar, China Estados Unidos y después México, como se muestra en la ilustración 2 («Observatorio de precios - La superficie de siembra de frijol disminuyó este año en comparación con el año agrícola 2014.», s. f.)

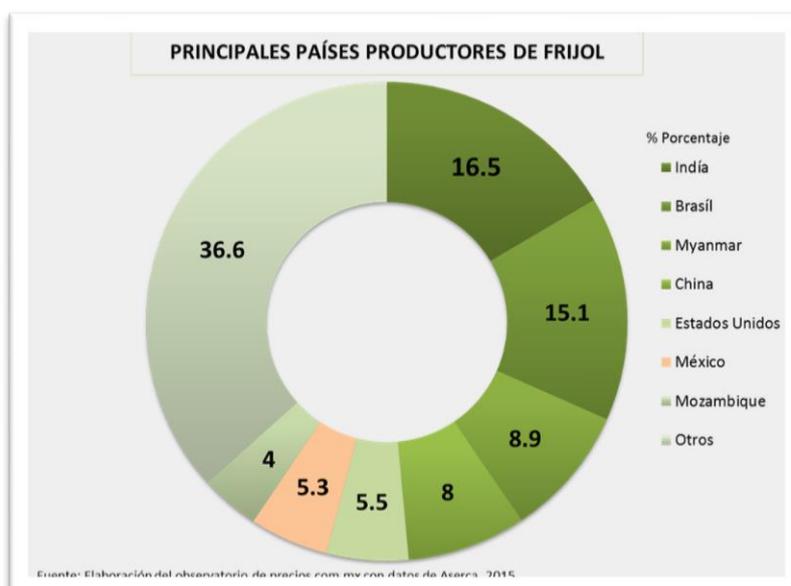


Ilustración 2: Principales países productores del fréjol

Es cultivado prácticamente en todo el mundo, Según la FAO en 129 países de los cinco continentes, se reporta la producción de fréjol. La zona de mayor producción y consumo es América Latina, más del 45% de la producción mundial proviene de esta región, siendo considerado como uno de los productos básicos de la economía campesina («El cultivo de frijol historia e importancia», 2010)

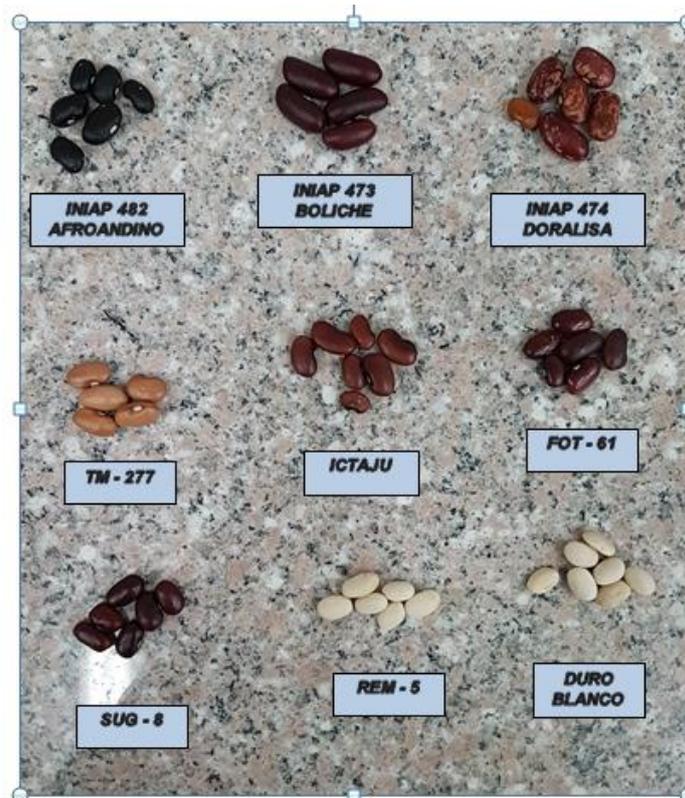
Entre los países más productores se destacan en orden de importancia: India, Brasil, Myanmar, China, Estados Unidos, México y Mozambique. Estos países contribuyeron con el casi 64% de lo producido, mientras que otros países lo hicieron con casi 37% de la producción.

## **2.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS VARIEDADES SELECCIONADAS.**

Existe una gran variedad de fréjol de acuerdo a las características de su grano en especial en lo relativo a su tamaño y color.

Dentro de color, se encuentran variedades de fréjol como blanco, crema, amarillo, café marrón, rosado, rojo, morado, negro u otros.

Entre las variedades de fréjol común seleccionadas para este trabajo tenemos (Ilustración 3): INIAP 482 AFROANDINO, INIAP 473 BOLICHE, INIAP-474 DORALISA, TM -277, ICTAJU, FOT – 61, SUG – 8, REM – 5 Y DURO BLANCO



**Ilustración 3: Variedades de *P. vulgaris* seleccionadas**

El frejol se lo clasifica de manera general en grupos de acuerdo a su color, blanco, crema, amarillo, café marrón, rosado, rojo, morado, negro u otros.

Las variedades de fréjol también se pueden clasificar considerando diversos criterios, como características agronómicas, están los días de floración, semillas por vaina, peso considerando 100 semillas secas, etc. Y sus características morfológicas como la longitud y ancho del grano seco, forma del grano, altura de la planta, etc. (Tabla 3)

Variedades	CARACTERÍSTICAS													
	AGRONÓMICAS						MORFOLÓGICAS							
	Días a Floración	Días a cosecha	Peso de 100 semillas secas (g)	Vainas por planta	Semillas por vaina	Rendimiento en grano seco (kg/ha)	Altura de la planta (cm)	Ramas por planta	Semillas por planta	Color de grano seco	Tamaño del grano seco	Longitud del grano seco (mm)	Ancho del grano seco (mm)	Forma del grano
<i>FOT-61</i>	40	82	24.66	13	5.3	1510	40	4	69	Rojo	Pequeño			
<i>SUG-8</i>	40	82	17.45	22	6	2276	41	6	120	Rojo	Pequeño			
<i>REM-5</i>	40	83	21.04	17	5.1	1139	34	4	87	Blanco	Pequeño			
<i>DURO BLANCO</i>	40	83	22.24	7	3	942	35	5	20	Blanco	Pequeño			
<i>INIAP 474 - Doralisa</i>	30 a 40	85 a 90	47 a 52	8 a 12	3 a 4	2226	35 a 55	4	25	Rojo moteado	Grande	15 a 18	8 a 10	Arriñonado
<i>INIAP 473 - Boliche</i>	32 a 36	80 a 90	48 a 57	7 a 11	3 a 5	2224	33 a 50			Rojo	Grande	14 a 18	7 a 9	Arriñonado
<i>INIAP 482 - Afroandino</i>	50 - 60	122	18	17 - 23	4 a 5	1894	47			Negro	Pequeño			Ovalado
<i>TM-277</i>	34	82	27.59	17	3.5	1427	38	2	59	Café claro	Pequeño			
<i>ICTAJU</i>										Café oscuro	Pequeño			

**Tabla 3: Características agronómicas y morfológicas de las variedades de *P. vulgaris* seleccionadas para el estudio**

## **2.3 SITUACIÓN DEL FRÉJOL EN EL ECUADOR**

El fréjol es especialmente importante en la alimentación de mujeres y niños; además, tiene gran importancia económica, pues genera ingresos para millones de pequeños agricultores, es una especie de clima templado y por tanto, no crece bien en zonas frías o calientes. El umbral térmico de la especie es de 10° C como temperatura mínima y 25° C como temperatura máxima.

Provincias como Bolívar, Chimborazo, Imbabura, Azuay Y Carchi, donde la producción del cultivo de fréjol tierno y seco se realiza en mayor parte. Las enfermedades más frecuentes a nivel nacional que se presentaron en la época de invierno: Virus del Mosaico Dorado (BGMV), La Roya (*Uromyces appendiculatus*) y la Atracnosis (*Colletotrichum lindemut - hianum*). En cuanto a insectos, se presentaron más frecuente en la época de verano, las más importantes son: Mosca blanca (*Bemisia tabaci*), saltahojas (*Empoasca* sp.), Minadores de hoja (*Liriomyza trifolii* y *Agromyza* sp.).

Dentro del manejo y control de plagas en fréjol el principal problema es que la gama de hospederos alternos es amplia y siempre están presentes dentro del área del tipo de agricultor promedio, por ejemplo haba, hortalizas, papa, cucurbitáceas y algunas malezas.

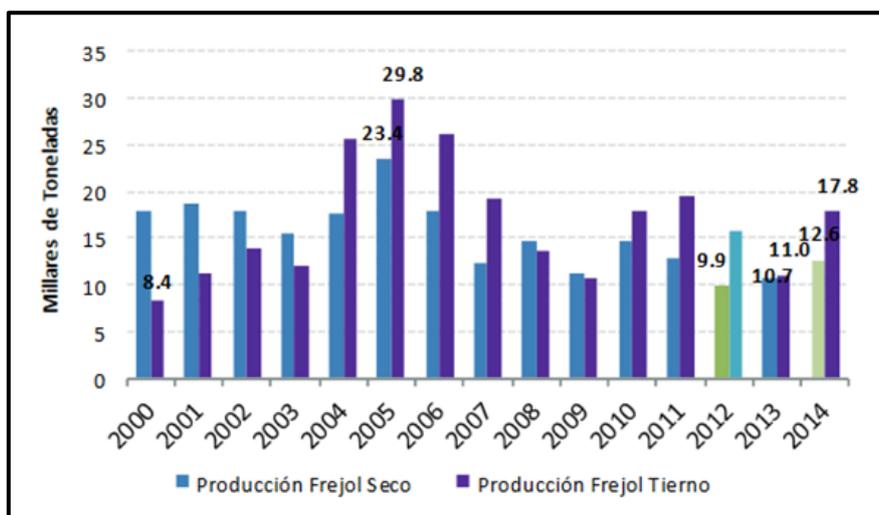
Debido a que las condiciones agroclimáticas se presentaron dentro de los parámetros normales y a controles fitosanitarios realizados a tiempo tanto de forma preventiva como curativa, el daño provocado por efecto de plagas tuvo una baja incidencia, siendo dicha afectación menor al 10% del cultivo, sin causar pérdidas que superen el umbral económico (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca, 2014).

### **2.3.1 PRODUCCIÓN Y CONSUMO**

La leguminosa con mayor área y cultivo y consumo en el Ecuador es el fréjol se cosecha 89,789 hectáreas de las 105,127 hectáreas sembradas de esta

leguminosa en grano seco y 15,241 ha en verde o tierno de las 16,464 ha sembradas. En cuanto al rendimiento promedio registrado en Ecuador es bajo, 430 kg ha<sup>-1</sup> en monocultivo y 110 kg ha<sup>-1</sup> cuando está asociado con maíz (Emma Torres Navarrete et al., 2013)

El comportamiento de la producción nacional de frejol seco, registra en mayor nivel de producción en el año 2005, y para el año 2014 tan solo se logró una producción de 12,607 t de fréjol seco (Ilustración 4). Las principales provincias productoras de fréjol seco en el año 2014 fueron: Azuay con el 23.79% de la producción nacional y con un rendimiento 0.29 t/ha, seguida de Los Ríos con el 21.27% de la producción nacional y con un rendimiento de 0.74 t/ha (Tabla 4 ) (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca, 2014)



**Ilustración 4: Producción nacional del frejol tierno y seco desde el año 2000 al 2014.**

Entre las provincias principales productoras de fréjol seco en el año 2014 fueron: Azuay, Los Ríos, Bolívar, Imbabura y Otros.

Superficie, Producción y Rendimientos de Fréjol Seco				
PROVINCIA	2014			
	Superficie sembrada (ha)	Superficie cosechada (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t/ha)
Total Nacional	29,658	26,650	12,607	0.47
Azuay	11,489	10,484	2,999	0.29
Los Ríos	3,803	3,602	2,681	0.74
Bolívar	3,467	2,810	1,499	0.53
Imbabura	2,109	1,787	1,385	0.78
Otros	8,790	7,968	4,042	0.51

Tabla 4: Superficie, Producción y Rendimientos de fréjol seco.

### 2.3.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA EN EL ECUADOR

Fréjol común (*P. vulgaris*) fue domesticado hace 8000 años en las Américas y en la actualidad es un alimento básico en todo el mundo. Además de la ingesta calórica, fréjol común es también una fuente importante de proteínas y micronutrientes y es ampliamente apreciado en los países en desarrollo por su asequibilidad (en comparación con proteínas de origen animal) y su larga vida de almacenamiento.

Las importaciones mensuales nacionales para el año 2014, se registraron valores en los meses abril, junio y los últimos cuatro meses del año. El mes de diciembre registró el volumen más alto de importaciones con 36 t, mientras que el mes de junio fue el de menor volumen con 8 t. (Ilustración 5)

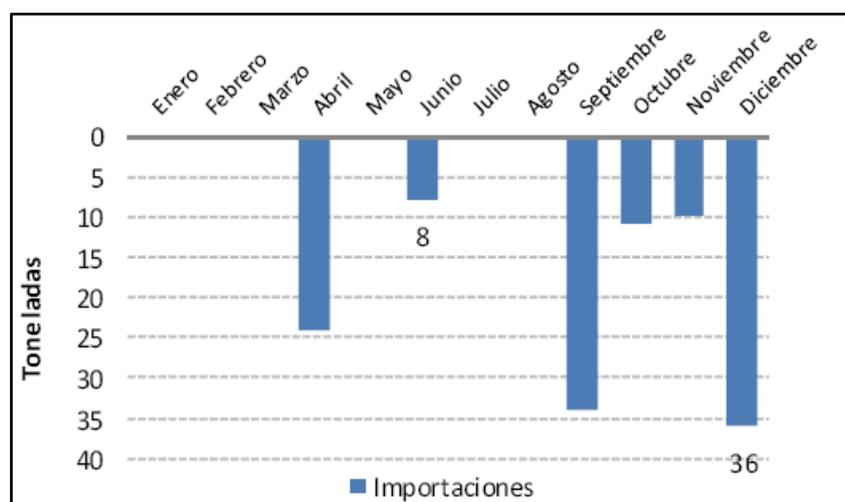
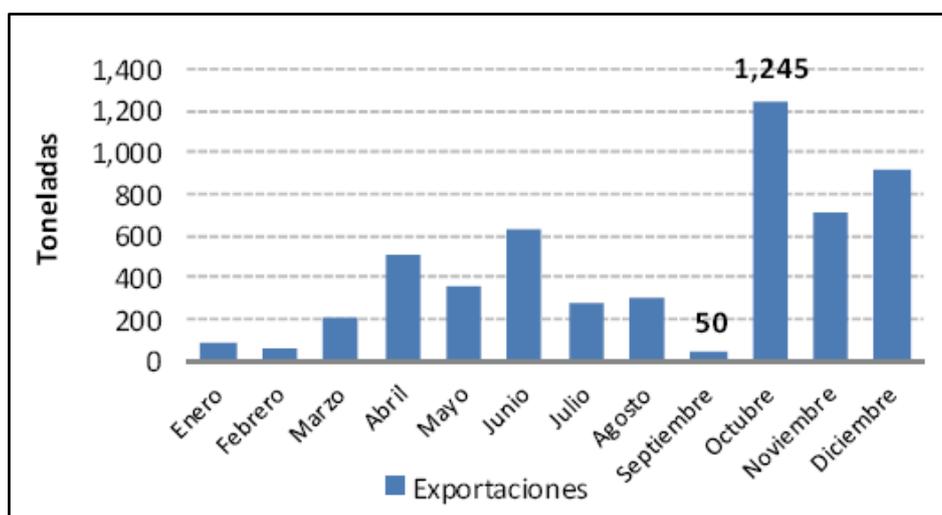


Ilustración 5: Importaciones nacionales de fréjol seco para el año 2014.

Las exportaciones ecuatorianas de fréjol tierno y seco en el 2014, se comercializaron durante todos los meses del año, se debe a la producción constante del cultivo durante todo el año. En el mes de octubre se registró el nivel más alto de exportaciones con 1,245 t, mientras que en el mes de septiembre se registró el menor nivel de exportaciones con 50 t. Los principales compradores fueron Colombia y Estados Unidos. (Ilustración 6)



**Ilustración 6: Exportaciones nacionales de fréjol tierno y seco durante el año 2014.**

## **2.4 PROTEÍNAS QUE SE EXPRESAN EN LAS PLANTAS ANTE EL ESTRES**

**Las proteínas LEA** se acumulan al inicio de la desecación de las semillas, y en respuesta a la falta de agua en las plantas, aún no se tiene claridad sobre su funcionamiento fisiológico y bioquímico. La acumulación de proteínas LEA (por sus siglas en inglés (Late Embryogenesis Abundant), se relaciona con la capacidad para soportar situaciones de deshidratación durante el crecimiento vegetal y en la última etapa de desarrollo de las semillas.

Se puede considerar que las propiedades físico-químicas de estas proteínas han servido como promotoras para seleccionar proteínas aptas para preservar y mantener las funciones celulares durante el ciclo de vida de los organismos

de los efectos nocivos causados por los cambios en la disponibilidad de agua (Olvera-Carrillo, Reyes, & Covarrubias, 2011)

Presencia de proteínas altamente hidrofílicas y que se acumulan ante condiciones de déficit hídrico (sequía, salinidad, congelamiento) se les ha denominado **hidrofilinas**. En plantas, las hidrofilinas es de un grupo de proteínas muy amplio y abundante conocido como proteínas LEA (del inglés Late Embryogenesis Abundant). Fueron encontradas por primera vez hace ya casi 30 años, por ser proteínas abundantes en la etapa tardía de la embriogénesis de la semilla, etapa en la cual ocurre una desecación natural muy alta. Además de acumularse en la semilla seca, posteriormente se encontró que también se acumulan abundantemente en tejidos vegetativos sometidos a déficit hídrico (sequía, salinidad y congelamiento) (César Luis Cuevas-Velázquez y Alejandra A. Covarrubias-Robles, 2011)

Estas proteínas contienen de 83 a 153 residuos de aminoácidos y pueden desempeñar un papel en el equipamiento de la semilla para la supervivencia, el mantenimiento de un nivel mínimo de hidratación en el organismo seco y la prevención de la desnaturalización de componentes citoplasmáticos. Ellos también pueden desempeñar un papel durante la imbibición mediante el control de la absorción de agua («Plant seed proteins», 2016).

Aminoácidos que forman parte de las proteínas y que están codificados en el material genético es la **prolina**, con una conformación rígida, y esencial para el metabolismo primario. Varios estudios han mostrado que el contenido de prolina aumenta en distintas condiciones de estrés. En plantas estresadas la acumulación de prolina tiene una función de protección, sin embargo los resultados varían en comparación entre acumulación de prolina y tolerancia al estrés en plantas. Entre las funciones que puede tener la prolina es la ser una molécula chaperona capaz de proteger la integridad y el plegamiento de las diferentes enzimas. Estudios le han asignado una característica antioxidante, también cumple ciertas funciones regulatorias y actúa como molécula señal. La función de la prolina es: como osmolito, estabilización de macromoléculas, un destino para el exceso de reductantes y almacenamiento de carbono y

nitrógeno para usar luego de transcurrido el déficit hídrico (LAS PROTEÍNAS EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO EN PLANTAS, 2014)

**Proteínas de choque térmico (HSPs)** proteínas ubicuas, se encuentran en células vegetales y animales. Es inducido por una gran variedad de problemas, incluyendo la exposición al frío, la luz ultravioleta, la cicatrización de heridas, la reformación de tejidos, o estreses bióticos. Por lo tanto, el término "proteína de choque térmico" es un nombre inapropiado ya que muchos factores distintos de calor inducen la expresión de genes hsp.

HSPs son juegan un importante rol en la homeostasis celular en condiciones óptimas y perjudiciales de crecimiento en células procariotas y eucariotas, son responsables de plegamiento de proteínas, montaje, translocación, y la degradación durante el crecimiento y desarrollo celular normal. HSPs también intervienen en la estabilización de proteínas y ayudan al replegamiento de proteínas en condiciones de estrés. Muchos integrantes de la familia de HSPs realizan funciones de importancia como ser chaperonas moleculares en el control del plegamiento tridimensional de las proteínas y / o proteínas recién formadas dañadas por el estrés dentro de las células (Park & Seo, 2015).

Las **defensinas** son relativamente abundantes en tejido de la semilla podría proteger a las semillas a partir de hongos del suelo y por lo tanto mejorar la tasa de supervivencia de las plántulas. Las defensinas han sido también identificadas en otros tejidos, incluyendo las hojas, vainas, tubérculos, frutos, raíces, corteza y órganos florales. Cada órgano expresa al menos un gen defensina, algunos órganos expresan dos o más en Arabidopsis. Se expresan durante el crecimiento normal de la planta y el desarrollo. La mayoría de las defensinas de plantas se concentran principalmente en las células periféricas y células de estomas en las plantas lo cual es consistente con un papel de defensinas en la protección contra los agentes patógenos. (Stotz et al., 2009).

**Las proteínas relacionadas con la patogénesis (RP).** Los RP tienen propiedades físico-químicas típicas que les permiten resistir a pH ácido y la escisión proteolítica y así sobrevivir en los ambientes duros donde se producen: compartimento vacuolar o de la pared celular o espacios intercelulares. Estas proteínas incluyen: 1) las proteínas estructurales que se

incorporan en la matriz extracelular y participan en el confinamiento del agente patógeno; 2) las enzimas de metabolismo secundario, por ejemplo los de la biosíntesis de antibióticos de plantas; 3) las proteínas relacionadas con la patogénesis que representan importantes cambios cuantitativos en proteína soluble durante la respuesta de defensa. (Stintzi et al., 1993)

Las proteínas ***RP-10*** son pequeñas, estas proteínas tienen un amplio espectro de funciones de manera significativa en estreses bióticos y abióticos (Agarwal & Agarwal, 2013). En respuesta al estrés físico, químico y/o biológico, las plantas producen una serie de proteínas denominadas genéricamente como "pathogenesis-related proteins" (PR). Dentro de éstas se encuentra el grupo de las proteínas de la Clase 10 (PR10) cuya función, más allá de ser producidas en situaciones de estrés, permanece desconocida. Las proteínas PR10 tienen una amplia distribución en el reino vegetal. Se caracterizan por presentar una estructura altamente conservada compuesta por unos 160 aminoácidos (Emilio, s. f.)

#### **2.4.1 PROTEÍNAS COMUNES EL FRÉJOL.**

***Faseolina***, es la proteína de almacenamiento de las semillas y compone en gran parte del porcentaje total de la proteína. La globulina, que conforma la faseolina, consta de dos partes principales: vicilina y la legumina. La globulina utilizada en los estudios de proteínas ya que del total de proteína de la semilla consiste en 35-50% globulinas. La relación exacta varía entre los diferentes genotipos de fréjol (Seher Yıldız Madakbas & 1\*, Halima Awale<sup>2</sup> and James Kelly<sup>2</sup>, 2014)

### **2.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

Para el estudio de la estructura de una proteína, de la actividad de una enzima o el contenido proteico de un alimento, es necesario conocer cuantitativamente la concentración de las proteínas. Algunos métodos de cuantificación son Lowry, BCA, Bradford. Muchos de estos métodos se basan en: a) la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber la luz en el UV; b) para la formación

de derivados químicos; o c) la capacidad que tienen ciertas proteínas de unir ciertos colorantes.

El método de Bradford es un ensayo colorimétrico para la medición de la proteína total en una concentración dada. Involucra la unión de un colorante el Azul de Comassie a las proteínas en un medio ácido y su cambio de absorbancia de 465 a 595 nm. Debido a que el reactivo causa la precipitación de la proteína con el tiempo. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante, se caracteriza por ser un método sensible, simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación.

### **2.5.1 CUANTIFICACIÓN POR EL MÉTODO DE BRADFORD**

La concentración de proteínas de los extractos se determinó mediante una modificación del ensayo de Bradford, se incubaron durante 5 minutos 4  $\mu$ l de solución proteica y 200  $\mu$ L de reactivo de Bradford. Posteriormente se determinó la absorbancia a 595 nm y se calculó la concentración de proteínas de las muestras, comparando los valores de absorbancia de los extractos con los de soluciones de albúmina de concentraciones 250, 500, 750 y 1000 mg/L

## **CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 MATERIALES**

#### **3.1.1 INSTITUCIÓN: LABORATORIO**

Esta investigación se realizó en el Centro de Investigación Biotecnológica del Ecuador (CIBE), específicamente en el laboratorio de biología molecular de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL).

Cantón: Guayaquil

Provincia: Guayas

Parroquia: Tarqui

#### **3.1.2 MATERIALES DE OFICINA Y DE CAMPO**

##### **Materiales:**

- Bisturí
- Vidriería (vasos de precipitación, Erlenmeyer, probeta)
- Pinzas
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas (10 µl, 200 µl y 1000 µl)
- Mecheros
- Material vegetal
- Tubos eppendorf
- Tubos Falcom de 15 y 50 ml
- Material de oficina

##### **Equipos:**

- Campana de extracción
- Cámara de electroforesis vertical, Miniprotean III Biorad
- Equipo de IEF, Biorad
- Equipo de digitalización de imágenes

- Centrífuga
- pHmetro
- Agitador magnético
- Molino de bola

### **Reactivos**

- Poliacrilamida 40%.
- Solución Tris 1.875M, pH 8.8
- SDS 10%
- TEMED
- Persulfato de amonio 10%
- Agua destilada
- HCl
- Glicerol
- Mercaptoetanol 8.21%
- Glicina
- Azul de comassie
- Ácido acético
- Borato de Sodio

## **3.1.3 UNIVERSO Y MUESTRA**

### **Universo**

Para determinar el porcentaje de las muestras en su totalidad, con cada una de sus repeticiones se realizará un estudio completamente al azar.

### **Muestra**

Serán 9 muestras de variedades del INIAP

## **3.2 PROTEÓMICA COMPARATIVA**

### **3.2.1 PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL**

La extracción de proteínas comienza siempre por una ruptura celular o lisis, obteniéndose lo que se llama el extracto crudo. El objetivo de este paso es maximizar la liberación de las proteínas de interés, evitando en lo posible alteraciones secundarias por oxidación, proteólisis, etc.

Los granos de fréjol común (*Phaseolus vulgaris*) fueron pulverizados con nitrógeno líquido (liofilización) en un triturador de muestra, marca RETSCH modelo MM400, finalmente tamizadas para poder obtener como muestra final harinas de fréjol. Almacenar a temperatura ambiente.

### **3.2.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DEL ENDOSPERMO**

Para la extracción de las proteínas de *P. vulgaris*, se siguió el protocolo de Bollini y col (1999). 0.3 gr de las harinas obtenidas o el material molido se solubilizó en buffer borato de sodio 20 mM pH 9 y luego incubadas a 37°C, en movimiento constante de 1200 rpm, durante una hora, en presencia de inhibidores de proteasas que inhibe las serin, cisteín y calpain proteasas, específicamente desarrollado para el uso en electroforesis en dos dimensiones. Finalmente las muestras fueron centrifugadas por 15 min a 14000 rpm - 4°C y se tomó los sobrenadantes, parte donde esta mayormente concentrada la proteína del endospermo. Fueron almacenadas en tubos eppendorf a - 4°C.

### **3.2.3 VERIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS PRESENTE EN LOS EXTRACTOS.**

La cantidad de proteínas en la muestra analizada puede estimarse por diversos métodos. La mayoría de las proteínas absorben a una longitud de onda de 280nm, lo hacen de manera proporcional con su concentración. El resultado

de estas reacciones es el cambio de color en la solución, que es cuantificado mediante una medida de absorbancia.

Para la determinación de proteínas de los extractos se utilizó el método de Bradford (1976), en una placa multipocillos se coloca 20  $\mu$ l de solución proteica y 250  $\mu$ l de reactivo de Bradford y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se determinó la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas y se calculó la concentración de proteínas de las muestras, comparando los valores de absorbancia de los extractos con los de soluciones de albúmina de concentraciones 0.1 a 0.9 mg/mL

Para determinar la concentración de proteínas totales de la muestra a analizar los resultados de absorbancia se interpola a una curva de calibración construida utilizando una proteína estándar, por lo general albúmina sérica bovina (BSA bovine seric albumin), cuya concentración es conocida.

### **3.2.3.1 ELECTROFORESIS: SDS-PAGE**

La electroforesis SDS-PAGE consiste en separar moléculas biológicas en dependencia fundamental de su carga, bajo la influencia de un campo eléctrico. Necesitamos de dos placas de vidrio (una grande y una pequeña), un peine, un bloque de fundición y el soporte de fundición. Realizamos una electroforesis discontinua que consiste en un gel concentrador con bajo grado de reticulación (4%) y pH 6,8 (gel acumulador o "stacking gel"), y un gel separador con grado de reticulación mayor (10%) y pH de 8,8. (Tabla 5)

#### **Protocolo**

- Se limpia con alcohol muy detalladamente de los vidrios eliminando todo residuo de acrilamida que pueda tener, teniendo mucho cuidado de no romperlos.
- Se arma el equipo para poder colocar el gel de acrilamida.

- Una vez armado el soporte para el gel, verificamos que no tenga fuga, para esto llenamos con agua destilada en el lugar donde va el gel (parte interna entre los dos vidrios)
- Se prepara el gel (separador) de poliacrilamida al 10 % (lower)
- Finalmente colocamos el gel en la parte interna entre los vidrios (2/3 del total), el volumen casi perfecto para lo que se necesita. (Tabla 5)
- Llenamos el total de área de los vidrios con agua destilada con el objetivo de eliminar las burbujas que se forman, y permitir a la polimerización.
- Esperar para terminar la polimerización
- Por tratarse de un buffer discontinuo, preparamos un gel de acrilamida al 4% (Tabla 5).
- Una vez polimerizado el primer gel, desechamos el agua destilada, secamos con papel filtro.
- Se prepara el gel (concentrador) de acrilamida al 4 % (upper)
- Colocamos el gel hasta llenar la parte interna entre los vidrios, evitando que queden burbujas, se coloca el peine formador de pozos. Se deja polimerizar.

Reactivo	Gel Separador (10% - 5ml)	Gel concentrador (4% - 5ml)
Agua	2.648	1.558
40 % A/Bis	1.250	0.200
1.875M Tris, pH 8.8	1.000	.....
1.25M Tris, pH 6.8	.....	0.200
10% SDS	0.050	0.020
10% AP	0.050	0.020
TEMED	0.0025	0.0025

**Tabla 5: Soluciones para la preparación de los geles de poliacrilamida en sus respectivos porcentajes**

#### **Preparación y corrida electroforética de las muestras para el SDS-PAGE**

- Colocamos 8  $\mu$ l del sobrenadante de las muestras de *P. vulgaris* y 2.7  $\mu$ l del buffer de muestra en un eppendorf de 200  $\mu$ l.
- Se incubaron las muestras a 100°C, por 5 minutos.
- Se deja a temperatura ambiente y están listas para la electroforesis SDS-PAGE.
- Se cargó las muestras preparadas en cada uno de los pocillos que tiene el gel, de igual manera el marcador molecular.
- Se colocó el gel en la cubeta de electroforesis y la llenamos con el buffer de corrida (1X), tapamos la cubeta, conectamos el equipo a la fuente de poder y aplicar corriente constante (100 v) por 2 h aproximadamente y comienza la corrida electroforética.

### **3.2.3.2 ELECTROFORESIS EN SEGUNDA DIMENSIÓN (2D-PAGE + ISOELECTROENFOQUE)**

Básicamente consta de 4 etapas:

- La rehidratación de la tira
- Primera dimensión o isoelectroenfoque (IEF)
- El equilibrio de las tiras
- Segunda dimensión o 2D-PAGE

#### **La rehidratación de las tiras**

Para este trabajo se usaron tiras IpG de General Electric (Estados Unidos) con un intervalo de pH de 3 – 10 NL, de siete centímetros de longitud. La cantidad de proteínas seleccionadas deben estar en solución con el buffer Ready Prep™ (2-D Started Kit Rehydration/Sample Buffer - BIORAD) para un volumen final de 125 µl. Se utilizó como soporte una bandeja de canales, se coloca en cada canal la mezcla (10 - 15 µl o 25 µl de los extractos de proteínas de los endospermos + la solución de hidratación) y luego las tiras con el gel (acrilamida deshidratada) hacia abajo, es muy importante identificar las muestras que se colocan en cada tira.

Por tratarse de un sistema abierto, se colocó una capa de aceite mineral (1500 µl aprox.) en la superficie de las tiras para evitar la evaporación, se deja por tiempo aproximado de 15 a 18 horas a temperatura ambiente (se aconseja hidratar toda la noche).

#### **Primera dimensión o isoelectroenfoque.**

Las muestras de proteínas que fueron incluidas en las tiras de acrilamida, se las expone a un campo isoelectrónico con la finalidad de realizar una primera dimensión en base a su punto isoelectrónico, que consiste en la migración de las proteínas en el gradiente de pH hasta situarse en el punto de pH donde la carga neta de las mismas será cero.

Para el montaje de las tiras se utilizó el equipo Protean i12 IEF Cell – Marca BIORAD, se debe acondicionar el soporte principal, colocamos los electrodos en el soporte donde van a ser colocadas las tiras, para cada extremo de la tira colocamos dos pequeñas piezas de papel filtro (se hidrata con 8ul de agua destilada) ayuda a evitar el paso de sales de buffer de rehidratación lo que ayuda al flujo de corriente

Retiramos la tira con la ayuda de unas pinzas de la bandeja de canales y la ubicamos con el gel hacia abajo cuidadosamente sobre las tiras de papel filtro (dirección + a -), la cubrimos con aprox. 2.500 µl de aceite mineral y llevamos al equipo isoeléctrico que permite programar el método de enfoque sugerido para las tiras, de tal manera que automáticamente ocurren los cambios de voltaje y se mantienen en cada tira el voltaje/hora. Adicionalmente este sistema cuenta con un software que monitorea en línea el proceso de enfoque.

Una vez terminado el enfoque de las tiras puede almacenarse por un tiempo no mayor a un mes, dentro de pipetas de plástico desechables debidamente rotuladas a -80°C

### **Equilibrio de las tiras**

Previo a la segunda electroforesis, en una bandeja con canales colocamos la tira con el gel hacia arriba e incubamos con los buffer Ready Prep™ (2-D Started Kit Equilibration Buffer I y II), se utilizó 300 µl de cada buffer, con un intervalo de tiempo de 15 min cada uno. Después de cada incubación se retiran y descarta cada una de las soluciones y finalmente las tiras están listas para la segunda dimensión.

### **Segunda dimensión o 2D-PAGE**

Realizamos la segunda separación de las proteínas en base a su peso molecular. Para esta parte utilizamos geles de poliacrilamida en condiciones disociantes y el acoplamiento de ambas dimensiones en un gel bidimensional (2D-PAGE). SDS se usa con un agente reductor y calor para disociar las proteínas.

## Protocolo

- Se requiere de vidrios limpios y completamente secos, peines y separadores.
- Se arma el equipo para poder colocar el gel de acrilamida
- Una vez armado el soporte para el gel, verificamos que no tenga fuga, para esto llenamos con agua destilada en el lugar donde va el gel (parte interna entre los dos vidrios).
- Se prepara el gel (separador) de poliacrilamida al 10% (lower).
- Mezclar bien y transferir rápidamente la solución mediante el uso de la pipeta de 1000  $\mu$ l al espacio entre los vidrios.
- Añadir una capa de etanol a la parte superior del gel, antes de la polimerización para enderezar el nivel del gel y eliminar las burbujas.
- Una vez que el gel haya polimerizado, esta listo para la colocar la tira. Eliminamos la capa de etanol, y colocamos la tira equilibrada (evitando que queden burbujas entre la tira y el gel), y en un extremo en un pequeña tira de papel de filtro colocamos 5  $\mu$ l del marcador molecular.
- Para sellar colocamos agarosa hasta llenar la parte interna entre los vidrios, evitando que queden burbujas. Se deja polimerizar.
- Se coloca el gel en la cubeta de electroforesis y la llenamos con el buffer de corrida (1X), tapamos la cubeta, conectamos el equipo a la fuente de poder y aplicar corriente constante (100 v) por 2 h aproximadamente y comienza la corrida electroforética.

### 3.2.4 VISUALIZACIÓN DE PROTEÍNAS. TINCIÓN.

Culminada la corrida electroforética, los geles se colocan en cubetas separadas, fueron teñidos con comassie blue para visualizar las proteínas. Se deja el gel en una bandeja tapada con 30 ml aproximadamente de azul de

Comassie por 15 min en movimiento constante. Seguido se retira el colorante, enjuagamos y dejamos con 100 ml de ácido acético al 10%, hasta el siguiente día.

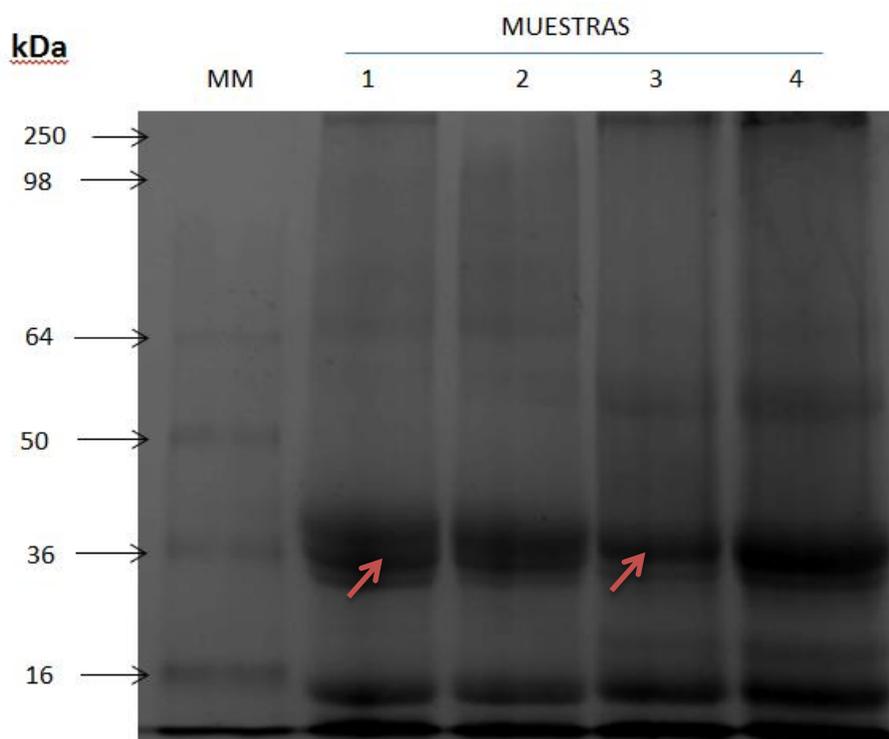
### **3.2.5 ANÁLISIS DE LOS PATRONES ELECTROFORÉTICOS**

Una vez teñidos los geles, se realizó el análisis comparativo de los mismos, se fotografiaron los geles con un equipo Perkin Elmer (Waltham, Massachussets), modelo ProXCISION, las imágenes digitales obtenidas fueron analizadas empleando el programa Phoretix 2D versión 2004. Y mediante la comparación de imágenes digitales de los diferentes geles se analizó los perfiles de expresión de los granos para determinar la presencia de spots resultados de las electroforesis en dos dimensiones de cada variedad.

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS

Para identificar las proteínas relacionadas al estrés biótico y abiótico de las plantas se seleccionó 9 variedades de *P. vulgaris*, se empleó un buffer de borato de sodio 20mM, pH 9, para extraer proteínas de fréjol común. Se realizó varios geles unidimensionales hasta obtener la cantidad exacta ( $\mu$ l) de extracto de proteína que se usaría para la investigación. En la Ilustración 7 se observó que el extracto de las proteínas cuatro genotipos de fréjol común, que son predominantes está entre los 60 kDa y 30 kDa, que corresponden a faseolinas y lectinas respectivamente.

Se observa pocas diferencias entre las variedades de *P. vulgaris*, por lo que para una mayor caracterización de las proteínas e identificar diferencia entre ellos se realizó electroforesis bidimensional (2D SDS-PAGE).

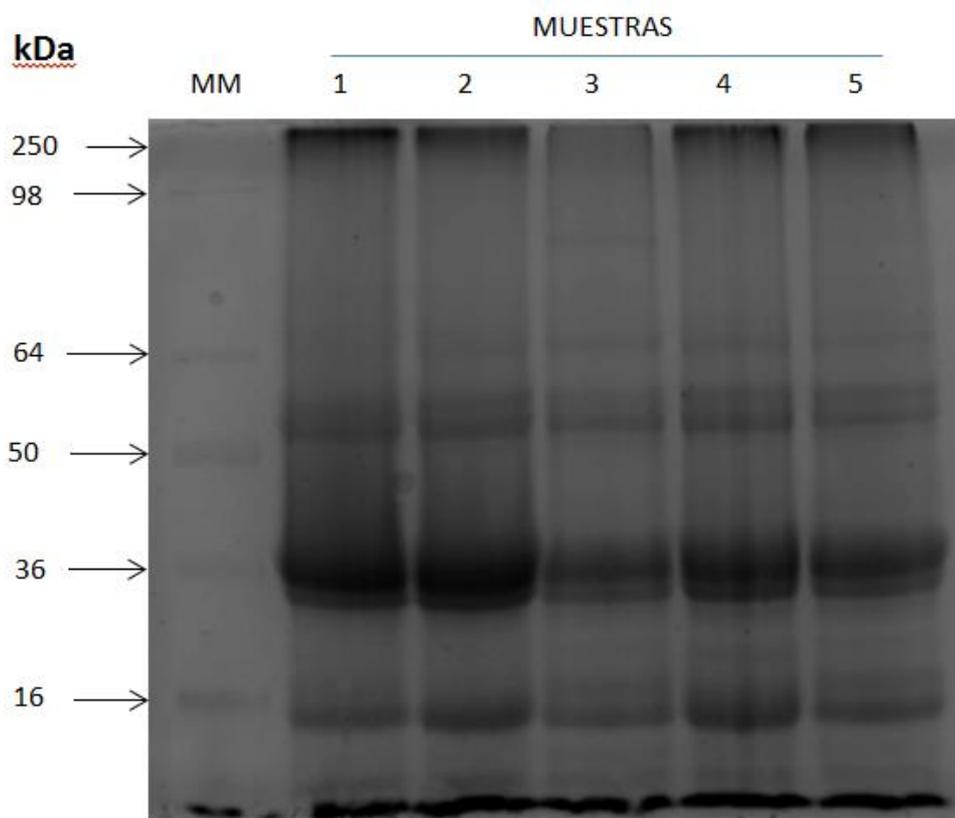


**Ilustración 7: Electroforesis unidimensional de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; MM; marcador molecular, carril 1: INIAP 474 Doralisa, carril 2: INIAP 473 Boliche, carril 3: INIAP 482 Afroandino, carril 4: TM-277. Las flechas rojas indican diferencias entre los genotipos (3 y 2 bandas)**

VARIETADES	MUESTRA ( $\mu$ l)	BUFFER/MUESTRA ( $\mu$ l)
INIAP 474 Doralisa	8	2.7
INIAP 473 Boliche	8	2.7
INIAP 482 Afroandino	8	2.7
TM-277	8	2.7

**Tabla 6: Cantidad ( $\mu$ l) de extractos de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris* para la electroforesis 1D.**

En la Ilustración 8 el patrón electroforético resultó muy parecido en todas las variedades, las bandas se encuentran entre 60 kDa y 30 kDa, siendo característica la presencia de la faseolina, proteína común de reserva y la lectina, proteína de defensa de *P. vulgaris*.



**Ilustración 8: Electroforesis unidimensional de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; MM: marcador molecular, carril 1: SUG-8, carril 2: REM-5, carril 3: FOT-61, carril 4: ICTAJU, carril 5: DURO BLANCO.**

VARIETADES	MUESTRA ( $\mu$ l)	BUFFER/MUESTRA ( $\mu$ l)
SUG - 8	8	2.7
REM - 5	8	2.7
FOT-61	8	2.7
ICTAJU	8	2.7
DURO BLANCO	8	2.7

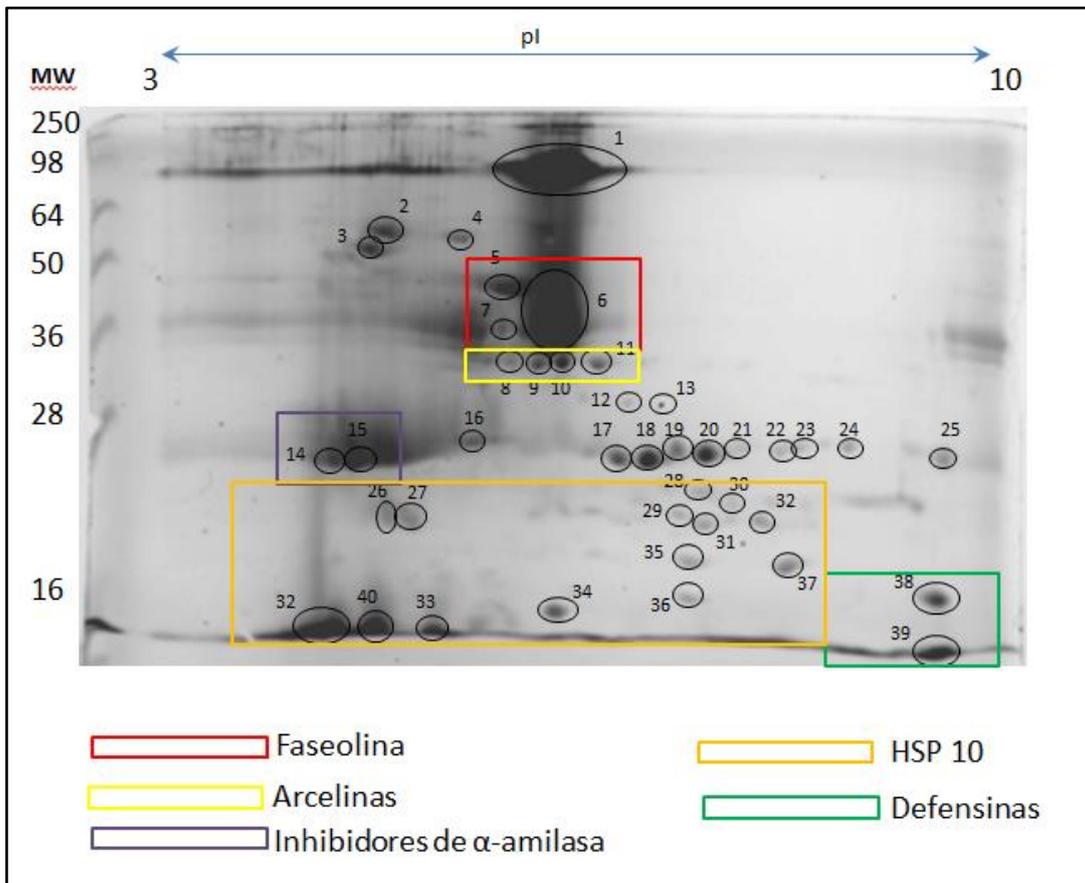
**Tabla 7: Cantidad ( $\mu$ l) de extractos de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris* para la electroforesis 1D.**

El resultado de la extracción de las proteínas del endospermo de *P. vulgaris* fueron separados mediante electroforesis 2D-SDS PAGE AL 10% en el cual estas son separadas por su tamaño, forma y carga eléctrica, y que permitió obtener los proteomas de las muestras de cada una de las variedades seleccionadas, se observa diferencias en el total de proteínas reveladas en los geles bidimensionales, así también como proteínas o grupos de proteínas presentes en una variedad pero ausentes en otras.

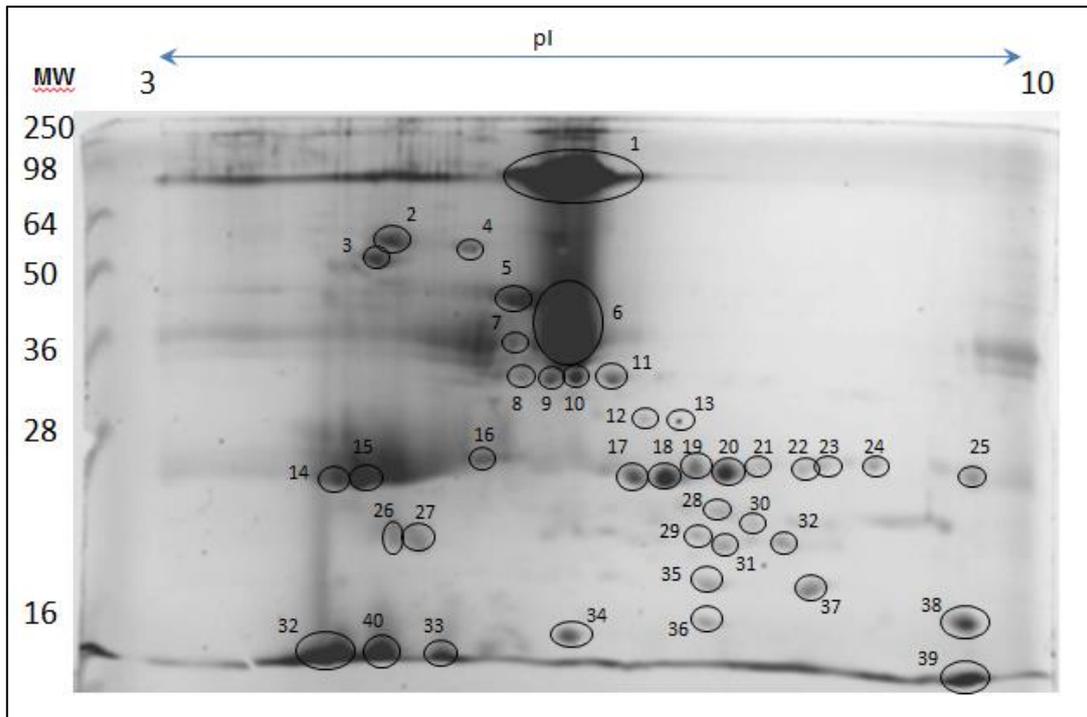
La faseolina se observa claramente en todas las variedades, proteína de 50 kDa y un punto isoeléctrico ácido, se lo considera un control interno para la electroforesis 2D. Punto isoeléctrico (pI) y masa molecular (MW) se utilizó como criterio para la identificación de las proteínas comunes; arcelina rango de pH entre 5,6 y 6,2 una masa molecular entre 30 y 38 kDa; fitohemaglutinina rango de masa molecular entre 28 y 32 kDa pI entre 4,65 y 5,20 e inhibidores de  $\alpha$ -amilasa masa molecular entre 26 y 29 kDa y pH isoeléctrico entre 4,90-5,30. Y de otras proteínas relacionadas con el estrés; HSP10, una masa molecular entre 15 y 30 kDa; dehidrinas con una rango de masa molecular que va entre 9 y 200 kDa; defensinas con un pH de 9 y masa molecular entre 5 y 7 kDa.

En la variedad INIAP 482 AFROANDINO se observa un total de 40 *spots* (Ilustración 10), de los cuales considerando su masa molecular y punto isoeléctrico encontramos 3 en el rango de las faseolinas, 4 en el rango de las arcelinas, 2 en el rango de los inhibidores de alfa amilasa, 14 en el rango de

HSP10 y 2 en el rango de las defensinas (Ilustración 9), por ser la variedad con mayor número de *spots* y en la que se determinó la presencia de *spots* de proteínas comunes y con relación al estrés, se utilizó como patrón para realizar el análisis comparativo entre los geles.



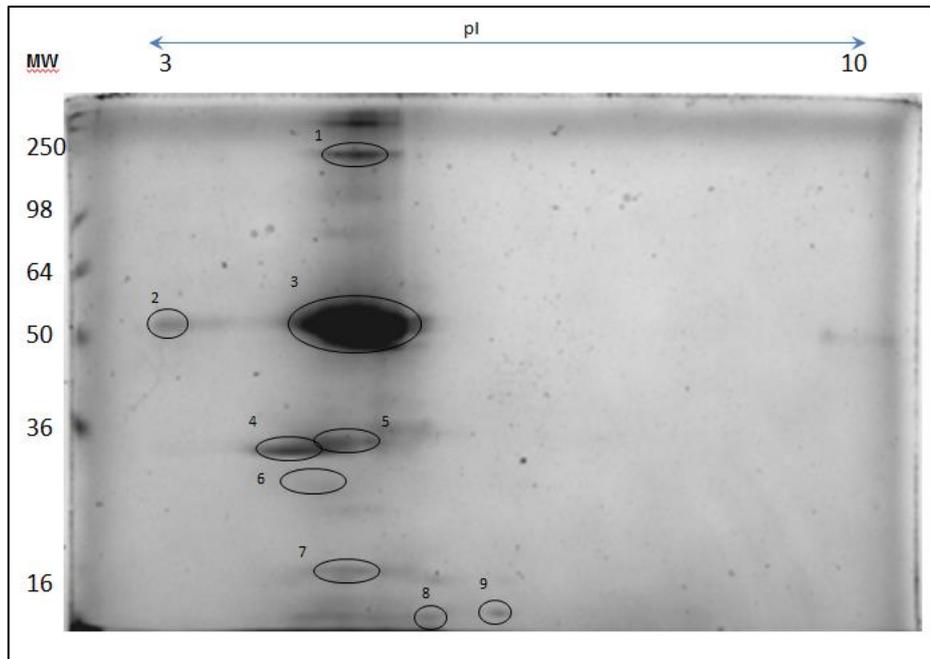
**Ilustración 9: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad INIAP - 482.** En la parte superior se muestra la escala de pI y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en kDa). El recuadro rojo indica la región del gel correspondiente a las faseolinas, el recuadro amarillo a la región de las arcelinas, el recuadro azul la región correspondiente a los inhibidores de alfa amilasa, el recuadro naranja a la región de las HSP10 y el recuadro verde a la región de las defensinas.



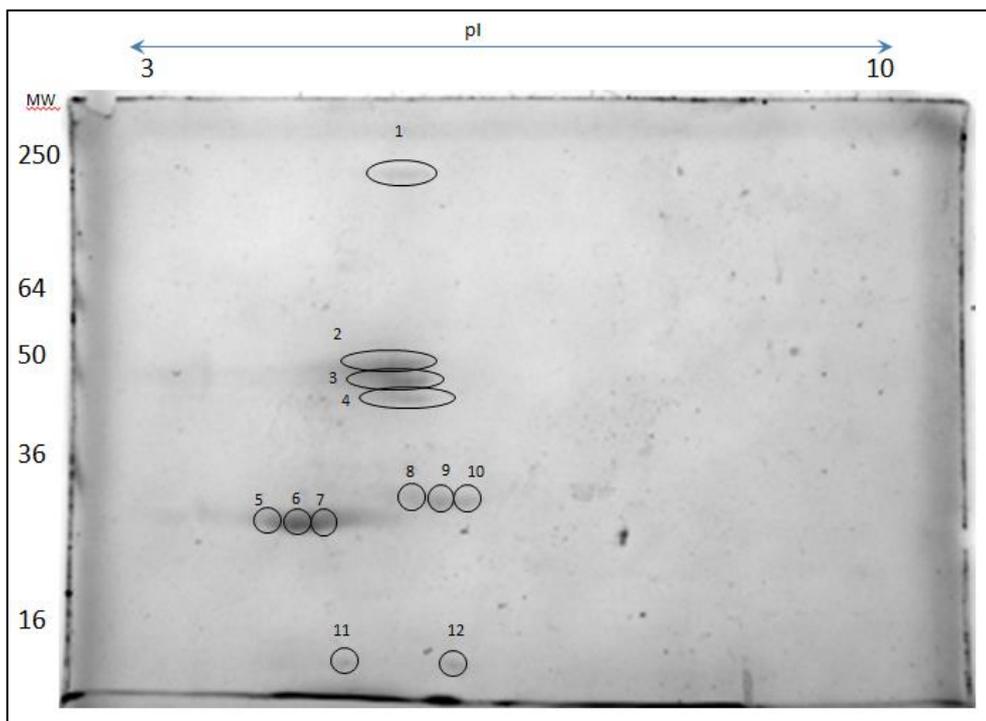
**Ilustración 10: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad INIAP - 482.** En la parte superior se muestra la escala de pI y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en kDa). 12  $\mu$ l de proteínas fueron aplicadas en tiras de 7 cm de rango de pH 3-10.

La variedad INIAP 473 Boliche (Ilustración 11) mostró un total de 9 spots, de los cuales se encontró proteínas en el rango de las faseolinas, arcelina, fitohemaglutinina, inhibidores de alfa amilasa y defensinas, a pesar de encontrar pocos *spots* en esta variedad, se comparó con el gel INIAP 482 AFROANDINO (Ilustración 10), que no se encontró proteínas en el rango de las fitohemaglutinina.

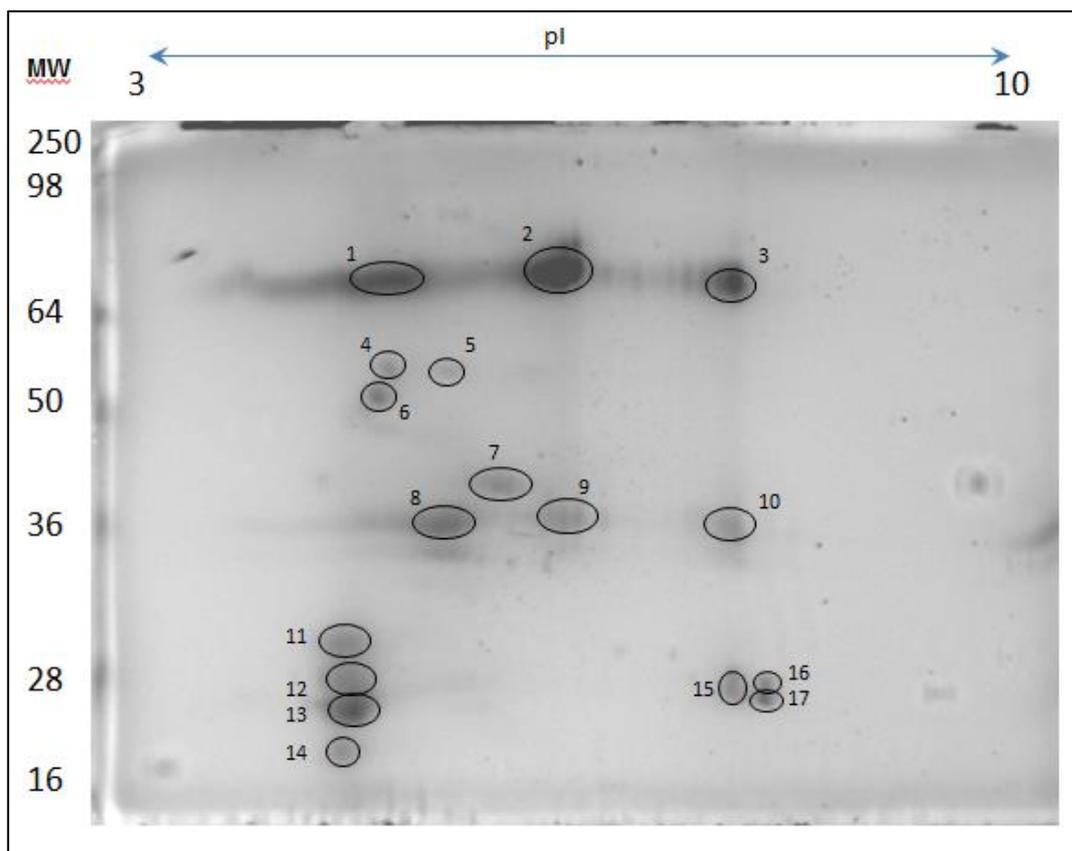
Para la variedad INIAP 474 Doralisa (Ilustración 12), se ubicó 12 spots cuyas proteínas dentro de los rangos pH y masa molecular correspondieron a faseolina, fitohemaglutinina, inhibidores de alfa amilasa, arcelina y defensinas que comparado con el gel INIAP 482 AFROANDINO (Ilustración 10), esta no presentó proteínas del rango de las fitohemaglutininas.



**Ilustración 11: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad INIAP – 473 Boliche.** En la parte superior se muestra la escala de pI y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en kDa). 25  $\mu$ l de proteínas fueron aplicadas en tiras de 7 cm de rango de pH 3-10.

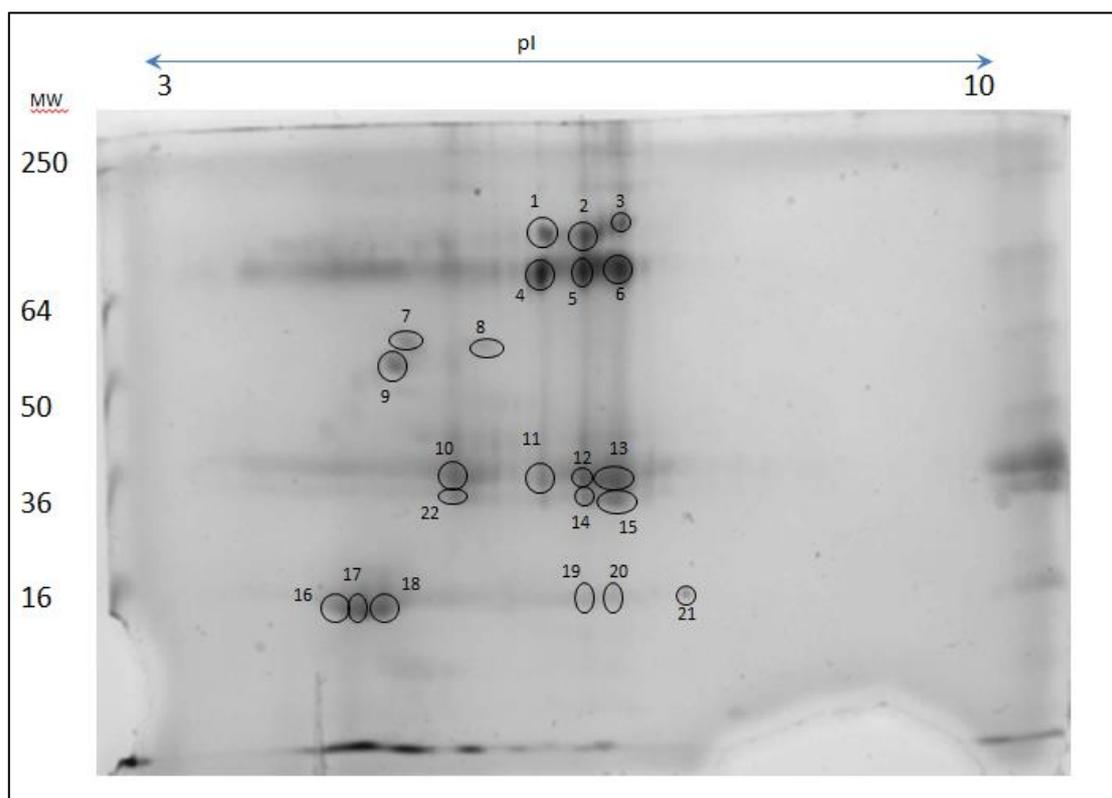


**Ilustración 12: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad INIAP - 474.** En la parte superior se muestra la escala de pI y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en kDa). 25  $\mu$ l de proteínas fueron aplicadas en tiras de 7 cm de rango de pH 3-10.



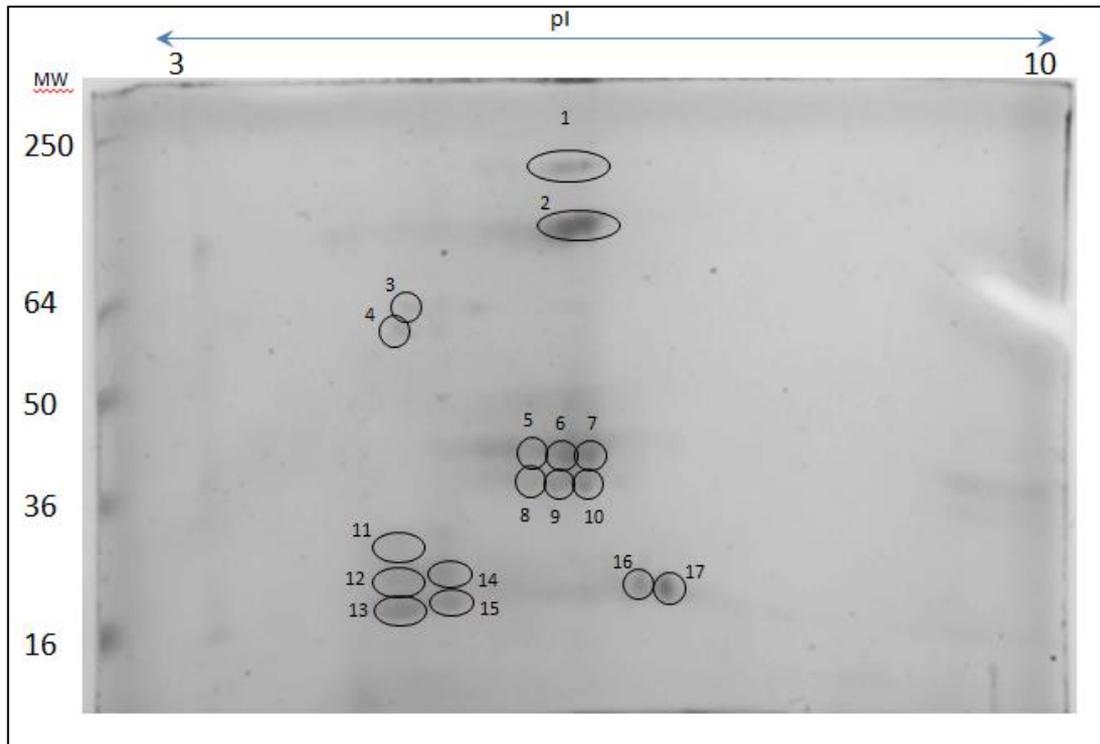
**Ilustración 13: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad TM - 277.** En la parte superior se muestra la escala de pI y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en kDa). 10  $\mu$ l de proteínas fueron aplicadas en tiras de 7 cm de rango de pH 3-10.

Se observó 17 spots para la variedad TM- 277 (Ilustración 13), se encontró la presencia de proteínas comunes que son faseolinas, arcelinas, fitohemaglutinina e inhibidores de alfa amilasa, en comparación con la variedad INIAP 482 AFROANDINO (Ilustración 10) no se encuentran spots en las regiones del gel que correspondan a las proteínas relacionadas con el estrés como son las HSP10 y las defensinas.



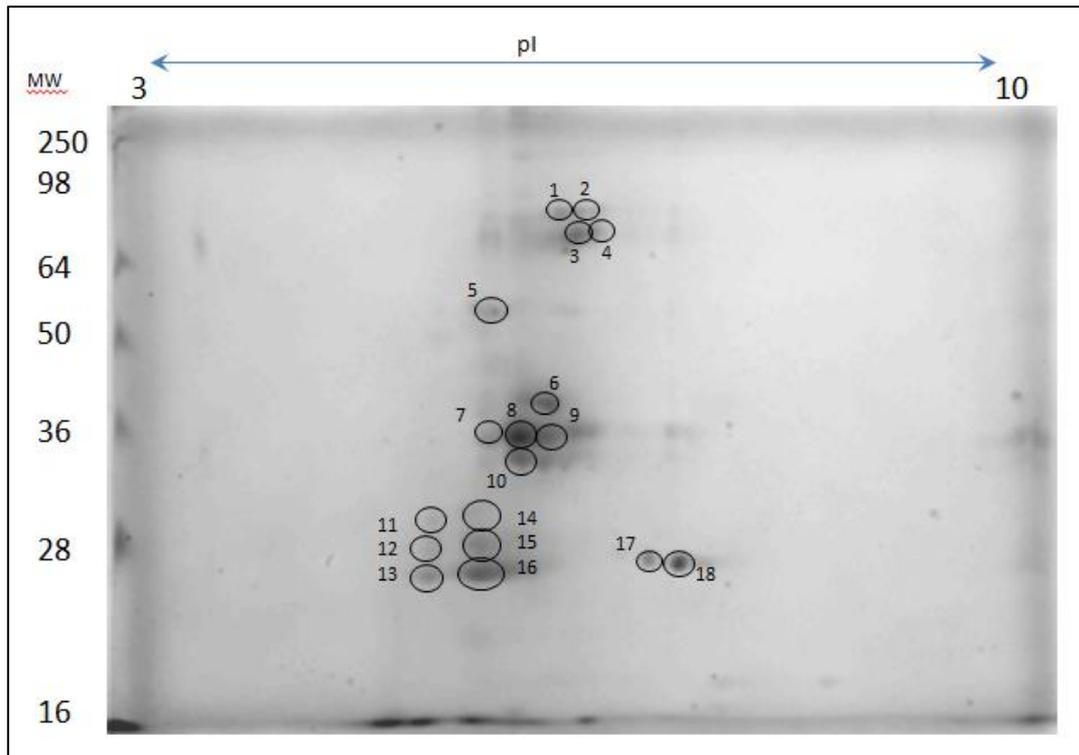
**Ilustración 14: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad SUG – 8.** En la parte superior se muestra la escala de pI y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en kDa). 10  $\mu$ l de proteínas fueron aplicadas en tiras de 7 cm de rango de pH 3-10.

22 spots fueron identificados para la variedad SUG – 8 (Ilustración 14), las proteínas encontradas dentro de los rangos de masa molecular y pH es la faseolina, proteína común característica de *P. vulgaris*; en comparación con la variedad patrón INIAP 482 AFROANDINO (Ilustración 10) no se observa proteínas relacionadas con la resistencia al estrés.



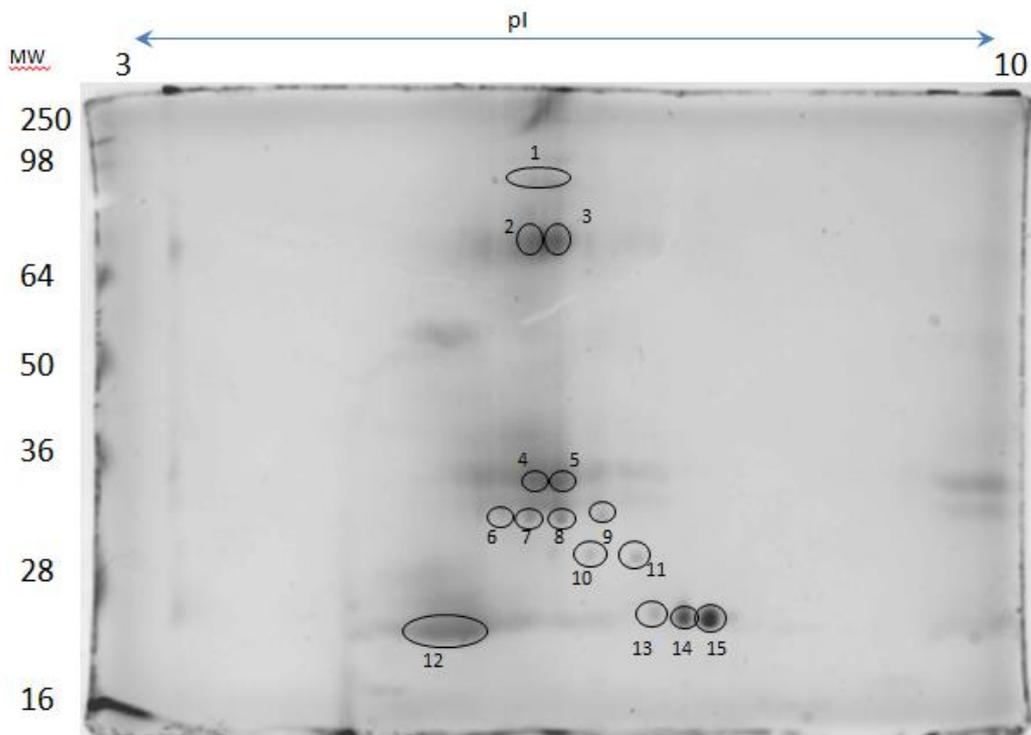
**Ilustración 15: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad REM - 5.** En la parte superior se muestra la escala de pI y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en kDa). 15  $\mu$ l de proteínas fueron aplicadas en tiras de 7 cm de rango de pH 3-10.

Las semillas de la variedad REM - 5 mostraron un total de 17 *spots* en las electroforesis en dos dimensiones, se encontró *spots* en la región del gel donde se ubicaría la faseolina, arcelina, fitohemaglutinina y los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa (Ilustración 15). Del total de *spots* no se observó la presencia de HSP10 y defensinas en comparación con la variedad INIAP 482 AFROANDINO (Ilustración 10).



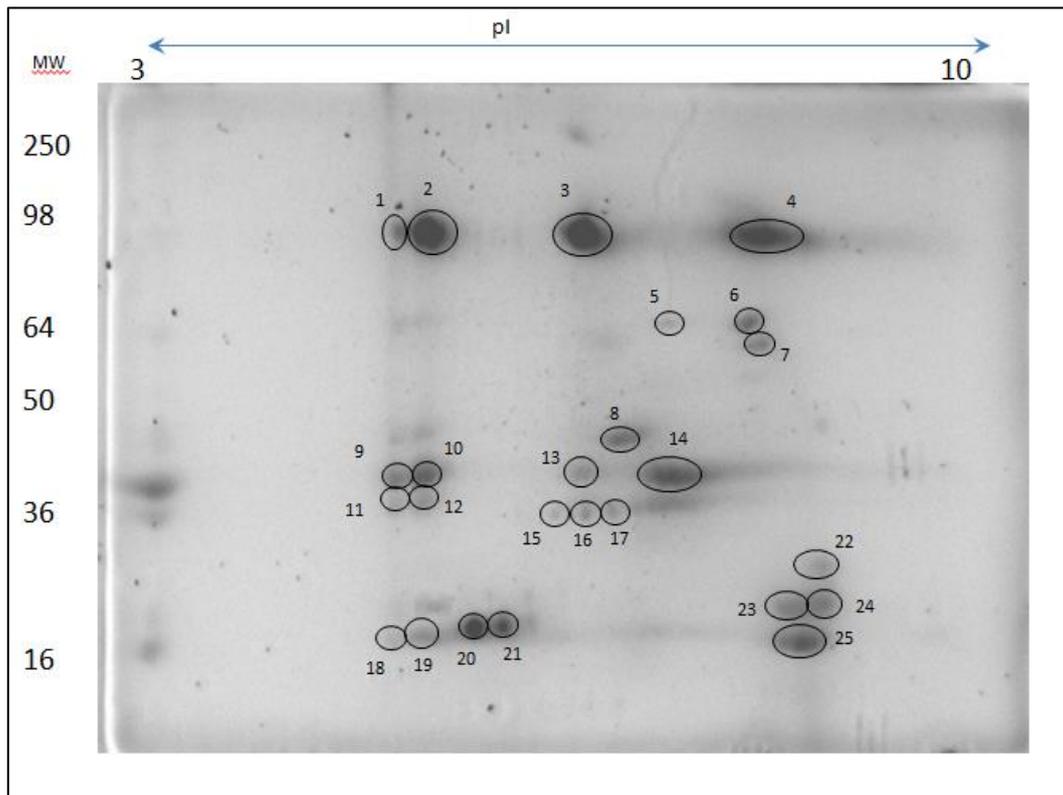
**Ilustración 16: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad FOT-61.** En la parte superior se muestra la escala de pI y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en kDa). 10  $\mu$ l de proteínas fueron aplicadas en tiras de 7 cm de rango de pH 3-10.

Un total de 18 spots se mostraron en la variedad FOT- 61 (Ilustración 16), se identificó proteínas para los rangos de faseolina, arcelina, fitohemaglutinina e inhibidores de alfa amilasa. Del total de *spots* no se observó la presencia de HSP10 y defensinas en comparación con la variedad INIAP 482 AFROANDINO (Ilustración 10).



**Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad ICTAJU.** En la parte superior se muestra la escala de pI y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en kDa). 15  $\mu$ l de proteínas fueron aplicadas en tiras de 7 cm de rango de pH 3-10.

Se observó 15 *spots* para la variedad ICTAJU (Ilustración 17), se encontró la presencia de proteínas comunes que son faseolinas, arcelinas, fitohemaglutinina e inhibidores de alfa amilasa, en comparación con la variedad INIAP 482 AFROANDINO (Ilustración 10) no se encuentran *spots* en las regiones del gel que correspondan a las proteínas relacionadas con el estrés como son las HSP10 y las defensinas.



**Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad FREJOL DURO BLANCO.** En la parte superior se muestra la escala de pI y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en kDa). 10  $\mu$ l de proteínas fueron aplicadas en tiras de 7 cm de rango de pH 3-10.

Un total de 25 spots se mostraron en la variedad FREJOL DURO BANCO (Ilustración 18), se identificó proteínas para los rangos de faseolina, arcelina como las proteínas comunes y las defensinas que son proteínas relacionadas al estrés. Del total de spots no se observó la presencia de HSP10 en comparación con la variedad INIAP 482 AFROANDINO (Ilustración 10).

## CONCLUSIONES

Para realizar la selección de los materiales se basó en los patrones unidimensionales que resultaron de las semillas de *P. vulgaris*. Luego se realizó las electroforesis bidimensionales y finalmente al análisis mediante un software especializado para identificar las proteínas de interés.

Los resultados permitieron obtener los proteomas correspondientes a las muestras de las variedades seleccionadas de *P. vulgaris* donde se observa similitudes y diferencias, lo que explica la presencia o ausencia de proteínas o grupo de proteínas entre un material u otro.

La presencia de la proteína faseolina, que representa el 90 % del total de proteínas de la semilla se la considera como un control interno para la electroforesis bidimensional.

Los resultados son útiles para la comprensión de las diversas funciones fisiológicas de las proteínas de frijol común y así mismo para la mejora de la calidad de la proteína frijol común a través de programas de mejoramiento, así como la manipulación genética.

El desarrollo de variedades adaptadas y/o mejoradas al estrés biótico y abiótico es una de las estrategias que contribuye a garantizar la seguridad alimentaria en zonas productoras de fréjol común.

El estudio de la proteómica comparativa y el conocimiento de los agricultores en conjunto podrían posibilitar un avance en la mejora de los cultivos de fréjol común.

La respuesta que expresa la planta después de ser expuesta a un tipo de estrés abiótico / bióticos depende de la etapa de desarrollo y las condiciones ambientales.

## RECOMENDACIONES

Realizar un bioensayo en el que las plantas hayan sido expuestas a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico y el análisis de su respectiva semilla y tener con mayor exactitud que proteínas tienen actividad de defensa o respuesta a determinado estrés.

Realizar un segundo análisis de proteómica comparativa, considerando como gel patrón una variedad que exprese más proteínas relacionadas al estrés.

Utilizar para la teñir los geles, la tinción de plata.

## BIBLIOGRAFÍA

Agarwal, P., & Agarwal, P. K. (2013). Pathogenesis related-10 proteins are small, structurally similar but with diverse role in stress signaling. *Molecular Biology Reports*, 41(2), 599-611. <http://doi.org/10.1007/s11033-013-2897-4>

Alfonso de Cires Segura. (2009). ESTRÉS NUTRICIONAL DE LAS PLANTAS. *Fisiología Vegetal ambiental*, 154.

Almudena Montoliu Vidal. (2010). RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE LOS CÍTRICOS SOMETIDOS A CONDICIONES DE ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO. ASPECTOS COMUNES Y ESPECÍFICOS, 213.

Castro-Guerrero, N. A., Isidra-Arellano, M. C., Mendoza-Cozatl, D. G., & Valdés-López, O. (2016). Common Bean: A Legume Model on the Rise for Unraveling Responses and Adaptations to Iron, Zinc, and Phosphate Deficiencies. *Frontiers in Plant Science*, 7. <http://doi.org/10.3389/fpls.2016.00600>

Censos, I. N. de E. y. (s. f.). Estadísticas Agropecuarias. Recuperado 23 de julio de 2016, a partir de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>

César Luis Cuevas-Velázquez y Alejandra A. Covarrubias-Robles. (2011). LAS PROTEÍNAS DESORDENADAS Y SU FUNCIÓN: UNA NUEVA FORMA

DE VER LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS Y LA RESPUESTA DE LAS PLANTAS AL ESTRÉS. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, Vol 14(2):97-105, 9.

Dr. José Armando Ulloa, 1, , M. en C. Petra Rosas Ulloa, 1, , Dr., José Carmen Ramírez Ramírez, ... 3. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente Año 3 No. 8*, 5.

El cultivo de frijol historia e importancia. (2010). *El cerealista*, 2.

Emilio. (s. f.). Victoriano Valpuesta - Julio 2015: Las proteínas PR10 de plantas. Recuperado 19 de junio de 2016, a partir de <http://www.sebbm.es/web/es/divulgacion/acercate-nuestros-cientificos/1055-victoriano-valpuesta-julio-2015-las-proteinas-pr10-de-plantas>

Emilio Rodrigo Basantes Morales. (2015). Manejo de cultivos andinos del Ecuador. *Comisión Editorial de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE*, 145.

Emma Torres Navarrete, 1, 3, , David Quisphe Caiza, 2, , Adolfo Sánchez Laíño, 1, 3, ... , Alexandra Haro Chong. (2013). CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE FRIJOL EN LA PROVINCIA DE COTOPAXI ECUADOR: CASO COMUNA PANYATUG. *Ciencia y Tecnología*, 9.

Ester Maria Murube Torcida. (2014). Estres oxidativo y respuestas fisiologicas a la acumulacion de metales pesados en *Betula celtiverica* micorrizada y no micorrizada cultivada en un suelo contaminado. *Universidad de Oviedo*, 33.

Evaluación de la Calidad de la Proteína de 4 Variedades Mejoradas de Frijol. (s. f.). Recuperado 11 de julio de 2016, a partir de [http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol14\\_1\\_00/ali03100.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol14_1_00/ali03100.htm)

F, L. P. M. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 27(2), 179-191.

Felix, L. (2011, junio 21). EL FREJOL: HISTORIA DEL FREJOL. Recuperado a partir de <http://elfrijolysuorigen.blogspot.com/2011/06/historia-del-frejol.html>

*Fisio vegetal estres salino*. (04:41:02 UTC). Recuperado a partir de <http://es.slideshare.net/gabozuiga1/fisio-vegetal-estres-salino-50331397>

Guo, M., Liu, J.-H., Ma, X., Luo, D.-X., Gong, Z.-H., & Lu, M.-H. (2016). The Plant Heat Stress Transcription Factors (HSFs): Structure, Regulation, and Function in Response to Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7. <http://doi.org/10.3389/fpls.2016.00114>

Hernández-López, V. M., Vargas-Vázquez, M. 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), 95-104.

Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., Gerszberg, A., Wiktorek-Smagur, A., & Kononowicz, A. K. (2014). Phaseolus vulgaris — Recalcitrant potential. *Biotechnology Advances*, 32(7), 1205-1215.  
<http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.06.001>

In-Depth Characterization of the Phaseolin Protein Diversity of Common Bean (Phaseolus vulgaris L.) Based on Two-Dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometry. (s. f.). Recuperado 5 de mayo de 2016, a partir de <http://connection.ebscohost.com/c/articles/82203164/in-depth-characterization-phaseolin-protein-diversity-common-bean-phaseolus-vulgaris-l-based-two-dimensional-electrophoresis-mass-spectrometry>

Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I. T., & Renaut, J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress — Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*, 74(8), 1301-1322. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.02.006>

Los daños y el estrés mecánico del cultivo causados por el viento. (2015, octubre 5). Recuperado a partir de <https://www.hortomallas.com/danos-viento-estres-mecanico-del-cultivo/>

*Mejoramiento genético del frijol (Phaseolus vulgaris L.): legado de variedades de América Latina 1930-1999*. (2000). CIAT.

Mensack, M. M., Fitzgerald, V. K., Ryan, E. P., Lewis, M. R., Thompson, H. J., & Brick, M. A. (2010). Evaluation of diversity among common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from two centers of domestication using «omics» technologies. *BMC Genomics*, 11, 686. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-11-686>

Miernyk, J. A., & Hajdich, M. (2011). Seed proteomics. *Journal of Proteomics*, 74(4), 389-400. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.12.004>

Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca. (2014). BOLETÍN SITUACIONAL FRÉJOL TIERNO Y SECO. *Coordinación General del Sistema de Información Nacional*, 8.

Namugwanya Margaret<sup>1,2</sup>, John Stephen Tenywa<sup>1</sup>, Erasmus Otabbong<sup>3</sup>, Drake N. Mubiru<sup>4</sup> & Twaha Ali, & Basamba<sup>1</sup>. (2014). Development of Common Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) Production Under Low Soil Phosphorus and Drought in Sub-Saharan Africa: A Review. *Canadian Center of Science and Education*, Vol. 7, 12.

Observatorio de precios - La superficie de siembra de frijol disminuyó este año en comparación con el año agrícola 2014. (s. f.). Recuperado 19 de julio de 2016, a partir de <http://observatoriodeprecios.com.mx/index.php/precios-productos/productos-agropecuarios/frijol/2861-la-superficie-sembrada-de-frijol-disminuyo-para-el-ano-agricola-2015>

Olvera-Carrillo, Y., Reyes, J. L., & Covarrubias, A. A. (2011). Late embryogenesis abundant proteins. *Plant Signaling & Behavior*, 6(4), 586-589. <http://doi.org/10.4161/psb.6.4.15042>

Park, C.-J., & Seo, Y.-S. (2015). Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. *The Plant Pathology Journal*, 31(4), 323-333. <http://doi.org/10.5423/PPJ.RW.08.2015.0150>

Peña-Castro, J. M. (2014). Respuesta molecular de las plantas ante el estrés por inundación: lecciones aprendidas del gen SUB1A. *Revista fitotecnia mexicana*, 37(4), 325-337.

Pereyra Cardozo M. 1,\* & A. Quiriban 1. (2014). LAS PROTEÍNAS EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO EN PLANTAS. *Revista de la Facultad de Agronomía UNLPam*, Vol 24(1), 13.

Plant seed proteins. (2016, junio 5). En *Wikipedia, the free encyclopedia*. Recuperado a partir de [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Plant\\_seed\\_proteins&oldid=723765484](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Plant_seed_proteins&oldid=723765484)

Proteomic Analysis of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry - ProQuest. (s. f.). Recuperado 2 de junio de 2016, a partir de <http://search.proquest.com/openview/f6f90a7a4657846ca1db43988674ce9a/1?pq-origsite=gscholar>

- Quint, M., Delker, C., Franklin, K. A., Wigge, P. A., Halliday, K. J., & van Zanten, M. (2016). Molecular and genetic control of plant thermomorphogenesis. *Nature Plants*, 2, 15190. <http://doi.org/10.1038/nplants.2015.190>
- Rejeb, I. B., Pastor, V., & Mauch-Mani, B. (2014). Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms. *Plants*, 3(4), 458-475. <http://doi.org/10.3390/plants3040458>
- Robison, F. M., Heuberger, A. L., Brick, M. A., & Prenni, J. E. (2015). Proteome Characterization of Leaves in Common Bean. *Proteomes*, 3(3), 236-248. <http://doi.org/10.3390/proteomes3030236>
- Seher Yıldız Madakbas, & 1\*, Halima Awale<sup>2</sup> and James Kelly<sup>2</sup>. (2014). Determination of Phaseolin Types in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) Varieties from Turkey. *Greener Journal of Agricultural Sciences*, Vol. 4 (2) pp. 039-045, 8.
- Sha Valli Khan, P. S., Nagamalliah, G. V., Dhanunjay Rao, M., Sergeant, K., & Hausman, J. F. (2014). Chapter 2 - Abiotic Stress Tolerance in Plants: Insights from Proteomics. En *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance* (pp. 23-68). San Diego: Academic Press. Recuperado a partir de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128008751000028>

- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., ... Fritig, B. (1993). Plant «pathogenesis-related» proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75(8), 687-706.
- Stotz, H. U., Thomson, J. G., & Wang, Y. (2009). Plant defensins. *Plant Signaling & Behavior*, 4(11), 1010-1012.
- Timperio, A. M., Egidi, M. G., & Zolla, L. (2008). Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics*, 71(4), 391-411. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.07.005>
- Uberegui, E., Hall, M., Lorenzo, O., Schroder, W. P., & Balsera, M. (2015). An Arabidopsis soluble chloroplast proteomic analysis reveals the participation of the Executer pathway in response to increased light conditions. *Journal of Experimental Botany*, 66(7), 2067-2077. <http://doi.org/10.1093/jxb/erv018>

## ANEXOS

Soluciones para geles no disociantes.

### 1) Buffer de la muestra 3X

Buffer de la muestra 3X	10 ml	20 ml	100 ml
Glicerol 87%	3,0 ml	6,0 ml	30,0 ml
Sol. Upper Tris 4X	3,75 ml	7,5 ml	37,5 ml
H2O dest. hasta	10 ml	20 ml	100 ml

Una vez preparado se le añade una pizca de azul de bromofenol.

### 2) Solución Lower Tris 4X

Solución Lower Tris 4X	500 ml	100 ml
Tris base	113,55 gr	22,71 gr
HCl 4N	24,0 ml	4,8 ml
Ajustar a pH 8,8		
H2O bidest hasta	500 ml	100 ml

### 3) Solución Upper Tris 4X

Solución Upper Tris 4X	500 ml	100 ml
Tris base	75,7 gr	15,15 gr
Disolver en H2O		
Ajustar a pH 6,8		
H2O bidest hasta	500 ml	100 ml

### 4) Buffer de corrida (5X) pH 8,3

Buffer corrida 5X	300 ml	600 ml	
Tris base 5X	4,5 gr	9,0 gr	15 gr/l
Glicina	21,6 gr	43,2 gr	72 gr/l
H2O bidest hasta	300 ml	600 ml	

Soluciones para geles disociantes.

1) Buffer de corrida (5X) pH 8,3

Buffer corrida 5X	300 ml	600 ml	
Tris base 5X	4,5 gr	9,0 gr	15 gr/l
Glicina	21,6 gr	43,2 gr	72 gr/l
SDS	1,5 gr	3,0 gr	5 gr/l
H2O bidest hasta	300 ml	600 ml	

Guardar a 4°C. Calentar a 37°C antes de usar si ocurre precipitación.  
Diluir 60 ml 5X stock con 240 ml H2O bidestilada para una corrida electroforética.

2) Buffer de la muestra 3X

Buffer de la muestra 3X	10 ml	20 ml	100 ml
Glicerol 87%	3,0 ml	6,0 ml	30,0 ml
Sol. Upper Tris 4X	3,75 ml	7,5 ml	37,5 ml
Mercaptoetanol (8,21%)	1,5 ml	3,0 ml	15,0 ml
SDS (disolver en 3 ml de agua)	0,9 gr	1,8 gr	9,0 gr
H2O dest. hasta	10 ml	20 ml	100 ml

Añadir una pizca de azul de bromofenol.

2) Solución Lower Tris 4X

Solución Lower Tris 4X	500 ml	100 ml
Tris base	113,55 gr	22,71 gr
HCl 4N	24,0 ml	4,8 ml
Ajustar a pH 8,8		
SDS 10%	20 ml	4 ml
H2O bidest hasta	500 ml	100 ml

### 3) Solución Upper Tris 4X

Solución Upper Tris 4X	500 ml	100 ml
Tris base	75,7 gr	15,14 gr
Disolver en H2O		
Ajustar a pH 6,8		
SDS 10%	20 ml	4 ml
H2O bidest hasta	500 ml	100 ml

Soluciones para ambos geles.

#### 1) Acrilamida-Bis-acrilamida (30% - 0,8%).

Acrilamida	30 gr	60 gr
Bis-acrilamida	0,8 gr	1,6 gr
H2O bidestilada	100 ml	200 ml

#### 2) Solución colorante.

Azul de Comassie	1 gr
Metanol	232,5 ml
Acido acético	35,0 ml
H2O bidestilada	500 ml

#### 3) Solución decolorante.

	1 l	2 lt
Metanol (5%)	100 ml	200 ml
Acido acético (7%)	140 ml	280 ml
H2O bidestilada	880 ml	1760 ml

**Bis-Tris 4–12% Gel** **Approximate Molecular Weights (kDa)**



Protein	Tris-Glycine	Tricine	NuPAGE® MES	NuPAGE® MOPS
Myosin	250	210	188	191
Phosphorylase	148	105	98	97
BSA	98	78	62	64
Glutamic Dehydrogenase	64	55	49	51
Alcohol Dehydrogenase	50	45	38	39
Carbonic Anhydrase	36	34	28	28
Myoglobin Red	22	17	17	19
Lysozyme	16	16	14	14
Aprotinin	6	7	6	—
Insulin, B Chain	4	4	3	—

Limited Product Warranty

**SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard. LC 5925**



**Variedades de Fréjol común de tres semanas de germinación**



**Variedades de fréjol comun de seis semanas de germinación**