

# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

## **Facultad Ciencias de la Vida**

Identificación de proteínas en el frejol común (*Phaseolus vulgaris*)  
asociadas al estrés hídrico.

### **PROYECTO INTEGRADOR**

Previo la obtención del Título de:

**Biólogo**

Presentado por:

Oscar Eduardo Cotto Yépez

Susan Pamela Vera de la Cruz

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2018

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a esa fuerza maravillosa llamada Dios, a mi hermosa familia, a mi mamá cuyo apoyo incondicional ha sido muy importante para poder cumplir esta meta, a cada uno de mis grandes amigos Fabricio, Allison, Ernesto y Bryan por siempre animarme cada vez que pensé en desistir, a las familias Jaramillo y Palacios por su acogida y amabilidad para conmigo y sobre todo para mí por haberlo logrado y no rendirme a pesar de todas las dificultades en el camino.

### **Oscar Eduardo Cotto**

Dedico el presente trabajo, en primera instancia a Dios Todopoderoso por darme la vida y salud para alcanzar mis metas; a mi familia en especial a mis padres, quienes con su apoyo incondicional y amor que me brindan, permitieron establecer en mí la fuerza y la perseverancia para seguir adelante, y por último a mis amigos que con alegría me brindaron ayuda en los momentos más importantes.

### **Susan Pamela Vera De La Cruz**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a la PhD Nardy Diez por haber confiado en nosotros y darnos la oportunidad de ejecutar este proyecto, a nuestros dos grandes maestros Winer Reyes y Jeffrey Vargas por siempre transmitirnos sus conocimientos y pasión por la ciencia y por último a la ESPOl por permitirnos aprender a lo largo de estos cinco años valiosas lecciones académicas y de vida.

**Oscar Eduardo Cotto**

**Susan Vera De La Cruz**

## DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Susan Vera* y *Oscar Cotto* damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

---

Oscar Eduardo Cotto  
Yépez

---

Susan Pamela Vera de  
la Cruz

# EVALUADORES

**PhD. Diego Arturo Gallardo Polit**

PROFESOR DE LA MATERIA

**PhD. Nardy Del Valle Diez García**

PROFESOR TUTOR

## RESUMEN

El frejol común (*Phaseolus vulgaris*) es una de las especies de leguminosas de amplio consumo en el Ecuador, debido a su valor económico, su aporte nutricional y su enriquecimiento de suelos, sin embargo, existe una baja en productividad en campo de este cultivo, siendo la principal causa el déficit hídrico; dado esta problemática se han desarrollado mejoramientos genéticos en algunas de las variedades de esta especie que pueden tolerar ciertos niveles de estrés bajo estas condiciones. El objetivo del presente trabajo, fue determinar las diferencias en los patrones de expresión de proteínas que responden al estrés hídrico de nueve variedades de frejol, para lo que se extrajeron y cuantificaron las proteínas, y posteriormente se separaron mediante geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y geles bidimensionales (2D- PAGE) en base a su peso molecular y punto isoeléctrico, los proteomas respectivos fueron analizados mediante pruebas estadísticas: análisis de varianza (ANOVA), análisis de componentes principales (ACP) e índice de correlación de Pearson, para encontrar las diferencias y semejanzas entre las diferentes variedades. Los patrones de expresión de proteínas entre todas las variedades evaluadas permitieron establecer que las variedades INIAP 482, FOT 61, ICTAJU Y DURO BLANCO son potencialmente resistentes a condiciones de cultivo en estrés hídrico debido a la alta expresión de dehidrinas, proteínas con características específicas para estas condiciones y que se presentan expresadas en 46,7% en INIAP 482 seguido de FOT 61, ICTAJU y DURO BLANCO con 26,4, 15,5 y 3,6% respectivamente.

**Palabras clave:** *Phaseolus vulgaris*, estrés hídrico, proteínas, SDS-PAGE

## ABSTRACT

The common bean (*Phaseolus vulgaris*) is one of the species of legumes widely consumed in Ecuador, due to its economic value, its nutritional contribution and soil enrichment, however, there is a low productivity in the field of this crop, being the main cause the water deficit, given this problem have developed genetic improvements in some of the varieties of this species that can tolerate certain levels of stress under these conditions. The objective of the present work, was to determine the differences in the patterns of expression of proteins that respond to the hydric stress of nine varieties of bean, for which the proteins were extracted and quantified, and later they were separated by means of gels of polyacrylamide (SDS-PAGE) and two-dimensional gels (2D- PAGE) based on their molecular weight and isoelectric point, the respective proteomes were analyzed by means of statistical tests: analysis of variance (ANOVA), analysis of main components (ACP) and Pearson correlation index, to find the differences and similarities between the different varieties. The patterns of protein expression among all varieties evaluated allowed to establish that the varieties INIAP 482, FOT 61, ICTAJU and DURO BLANCO are potentially resistant to growing conditions in hydric stress due to the high expression of dehydrines, proteins with specific characteristics for these conditions and that are expressed in 46.7% in INIAP 482 followed by FOT 61, ICTAJU and DURO BLANCO with 26.4, 15.5 and 3.6% respectively.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*, hydric stress, proteins, SDS-PAGE

## ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	5
RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS.....	VI
INDICE DE FIGURAS.....	VII
INDICE DE TABLAS.....	IX
CAPÍTULO 1.....	1
1    Introducción.....	1
1.1    Descripción del problema.....	3
1.2    Justificación del problema.....	4
1.3    Objetivos.....	4
1.3.1    Objetivo General.....	4
1.3.2    Objetivos Específicos.....	5
1.4    Marco teórico.....	5
1.4.1    Generalidades del Fréjol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ).....	5
1.4.2    Calidad nutricional.....	5
1.4.3    Escenario del Fréjol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) En Ecuador.....	6
1.4.4    Producción y consumo mundial de fréjol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ).....	7
1.4.5    Producción y consumo de ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) en Ecuador.....	8
1.4.6    Características de las variedades de frejol en Ecuador.....	9
1.4.7    Factores que afectan a la producción del fréjol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) 14	
1.4.8    Tipos de suelo de la Costa Ecuatoriana y su uso agrícola.....	15



1.4.9	Importancia de la fijación de nitrógeno en suelos por acción de las leguminosas .....	17
1.4.10	Tipos de estrés en las plantas.....	19
1.4.11	Estrés biótico en las plantas.....	20
1.4.12	Estrés abiótico en las plantas.....	20
1.4.13	Proteínas expresadas antes el estrés en las plantas .....	23
1.4.14	Proteínas presentes en semillas de fréjol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )..	23
CAPÍTULO 2 .....		26
2	Metodología .....	26
2.1	Materiales y Métodos.....	26
2.1.1	Extracción de proteínas.....	26
2.1.2	Determinación del contenido de proteína.....	27
2.1.3	Determinación de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE o primera dimensión. ....	29
2.2.3.1	Preparación de muestra de proteína de las diferentes variedades de fréjol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) y electroforesis. ....	31
2.1.4	Electroforesis de segunda dimensión (2D-PAGE e Isoelectroenfoque) .	32
2.1.5	Análisis de proteínas .....	34
2.1.6	Análisis estadístico.....	34
CAPÍTULO 3 .....		35
3	RESULTADOS Y ANÁLISIS .....	35
3.1	Análisis de geles 1D PAGE .....	35
3.2	Análisis de geles 2D PAGE .....	36
3.3	Análisis de varianza (ANOVA) .....	44
3.4	Análisis de correlación .....	45
3.5	Análisis de componentes principales (ACP) .....	47

CAPITULO 4.....	50
4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	50
4.1 Conclusiones .....	51
4.2 Recomendaciones .....	52
BIBLIOGRAFÍA.....	53
5 Referencias.....	53

## ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación
FIRA	Fidecomisos Instituidos en Relación con la Agricultura
CIAL	Comités de Investigación Agrícola Local
ROS	Especies reactivas de oxígeno
HPSs	Proteínas de choque térmico
LEA	Procesos de embriogénesis tardía
PHP	Fito hemaglutininas
BBIs	Inhibidores Bowman-Birk
TCA	Ácido Tri cloro acético
SDS	Dodecilsulfato sódico
IEF	Isoelectroenfoque
ANOVA	Análisis de varianza
ACP	Análisis de Componentes Principales
2D-PAGE	Two Dimensional – Polyacrylamide gel electrophoresis
CP1	Componente Principal 1
CP2	Componente Principal 2
MW	Molecular Weight (Peso Molecular)

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Producción Mundial 1998 – 2016 de los 6 países más destacados a nivel de producción. Fuente: (FAO, 2016).....	8
Figura 2: Variedades de frejoles ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ).....	10
Figura 3: patrones de banda para todas las variedades en gel 1D PAGE cada banda representa un gradiente de concentración de proteínas en base al peso molecular medido en kD.....	35
Figura 4: gel 2D PAGE para la variedad INIAP 482, proteínas de choque térmico (Hp), Leguminas(L), Faseolina (F), Lectinas (Le), Inhibidores de amilasa(A), Dehidrinas (Dh), Inhibidores de proteasa (P).....	37
Figura 5: gel 2D PAGE para la variedad INIAP 474.....	37
Figura 6: gel 2D PAGE para la variedad INIAP 473.....	38
Figura 7: gel 2D PAGE para la variedad TM-277.....	39
Figura 8: gel 2D PAGE para la variedad SUG-8.....	40
Figura 9: gel 2D PAGE para la variedad REM-5.....	41
Figura 10: gel 2D PAGE para la variedad FOT-61.....	42
Figura 11: gel 2D PAGE para la variedad ICTAJU. ....	43
Figura 12: gel 2D PAGE para la variedad DURO BLANCO.....	44
Figura 13: Análisis Post-Hoc en ANOVA de una vía, resalta el valor p menor al intervalo estadístico de confianza 0.05, la prueba de Tukey's HSD muestra las variedades de frejol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) que presentan más diferencias significativas entre grupos.....	45
Figura 14: Análisis de correlación en base a heatmap, establecido en base a un índice de correlación desde 1 a -0.5, los recuadros con mayor intensidad de rojo representan alta covarianza entre las diferentes variedades y los recuadros con mayor intensidad de azul representan a su vez menor covarianza entre las diferentes variedades.....	46
Figura 15: Grafica 2D de Análisis de Componentes Principales (ACP), se puede observar la distribución categórica de las distintas variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> y la correlación entre ellas. ....	48

Figura 16: Ubicación de las 9 especies de *Phaseolus vulgaris* y comportamiento de vectores – variables con base al análisis de componentes principales (CP) para los pesos moleculares promedio. Estableciendo los de mayor importancia para nuestro estudio “Leguminas y HPSs” (70,66 kDa), “Faseolinas” (53,11 – 47,63 kDa), “Inhibidores de Amilasa” (33,38 -28,37 kDa), “Dehidrinas” (25,34 kDa) e “Inhibidores de Proteasas” (13,60 – 7,12 kDa)..... 49

## INDICE DE TABLAS

**Tablas del 1-1 a 1-9: Características Principales de las variedades INIAP 482, 473, 474, TM 277, SUG 8, REM 5, FOT 61, ICTAJU, DURO BLANCO (M. Peralta et al., 2014)**

Tabla 1-1: INIAP 482 AFROAND .....	11
Tabla 1-2: INIAP 473 .....	11
Tabla 1-3: INIAP 474 -DORALISA .....	12
Tabla 1-4: TM 277 .....	12
Tabla 1-5: SUG 8 .....	12
Tabla 1-6: REM 5 .....	13
Tabla 1-7: FOT 61 .....	13
Tabla 1-8: ICTAJU .....	13
Tabla 1-9: DURO BLANCO .....	14
Tabla 2-1: Valores de las disoluciones a diferentes concentraciones. Los 5 valores seleccionados fueron los establecidos para el modelo ajustado.....	28
Tabla 2-2: Valores de absorbancia y concentración de las 9 variedades de frejoles ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) .....	29
Tabla 2-3: Cantidad de reactivos para la elaboración de geles de poliacrilamida en solución de concentración (4%) y separación (6%). .....	30
Tabla 2-4: Cantidad de muestra de proteínas y agua destilada por cada variedad de fréjol común ( <i>phaseolus vulgaris</i> ) para obtener una concetración de 15ug/ul. ....	31

# CAPÍTULO 1

## 1 INTRODUCCIÓN

El frejol común (*Phaseolus vulgaris*), es una leguminosa destinada a la alimentación de los seres humanos por medio de sus semillas o granos, su rango de distribución se encuentra dado a lo largo de los cinco continentes y en los países de Centroamérica y Sudamérica es uno de los componentes claves de su dieta.

Es además uno de los granos secos con mayor aporte de proteínas, nutrientes y micronutrientes como: hierro, zinc y provitamina A; y posee además compuestos que favorecen a la prevención de enfermedades y preservar la salud ( Zargar, y otros, 2017), en la dieta diaria se estima que su aporte calórico es de un 15%, asimismo su aporte proteico diario es de 36% de las calorías totales en África y América. ( Schmutz, y otros, 2014).

En Ecuador el cultivo de frejol común (*Phaseolus vulgaris*), se da tanto en la región litoral como en la sierra, siendo la segunda, en donde se concentra el mayor porcentaje del cultivo, constituyendo un 90%, con especies que presentan la cualidad de ser trepadoras; Los cultivos presentes en esta región abarcan todas sus provincias en sus diversos valles y estribaciones de cordillera; Sin embargo, en el litoral es posible encontrar cultivos de este grano en las provincias de El oro, Los Ríos, Manabí y Guayas.

La variedad de colores presentes en Ecuador incluye tonos claros (amarillo, blanco y crema) y de colores más oscuros como el rojo y rojo moteado debido a la demanda de exportación que se encuentra tomado auge en Colombia.

Actualmente es conocido que los cultivos se ven afectados por el cambio climático, esto no deja exento a los cultivos de fréjol, este factor presenta diversas manifestaciones las cuales se ven evidenciadas con la presencia de estrés biótico, mismo que genera en los cultivos disposición para la expresión de enfermedades cómo antracnosis, virus del mosaico de frejol, tizón bacteriano, roya del frijol(hongos), marchitez del fusarium, etc. Adicional a esto la presencia de estrés

abiótico se da debido a la alteración de los factores físicos y químicos en los cuales se incluye componentes como la sequía, calor, frío, salinidad, anegamiento, toxicidad a metales pesados. etc.). ( Zargar, y otros, 2017).

Estos componentes traen como consecuencia el desarrollo de respuestas adaptativas en plantas, con el objetivo de minimizar los efectos del estrés y garantizar su supervivencia (Lindemose, O'Shea, Jensen, & Skriver, 2013). El déficit de agua es sin duda una de las limitaciones ambientales que más problemas causan en el sector productivo agrícola y uno de los más comunes experimentados por diferentes cultivos, es por esto que su estudio ha sido de gran importancia, puesto que interfiere con el desarrollo y crecimiento normal teniendo un efecto significativo en rendimiento de su productividad (Bacallao, 2014).

En estudios previos se han establecido que las plantas de *Phaseolus vulgaris* se han adaptado al déficit hídrico mediante la inducción de genes específicos, sin embargo algunos de estos genes también se expresan durante el ciclo normal de la planta, específicamente en su etapa de desarrollo en donde los tejidos son más viables durante un largo periodo de tiempo en condiciones de deshidratación, es en esta etapa en donde se han realizado mediciones del Ácido Abscísico (ABA), una fitohormona cuyo papel se mantiene como un indicador de procesos relacionados con la tolerancia de estrés ya sea abiótico o biótico; dada esta acotación y a los estudios realizados a nivel genético, se establece que las proteínas están relacionadas directamente como respuesta al estrés de la planta, esto ha hecho posible que se realicen más estudios como identificación de proteínas de estrés y su caracterización de sus roles bioquímicos (Colmenero-Flores, Campos, Garcia rubio, & Covarrubias\*, 1997).

Es por esto que con la finalidad de mejorar la comprensión de los complejos mecanismos que tiene el frejol como respuesta al desafío que enfrenta contra el estrés por sequía, además del alto contenido proteico que aportan los cultivos del fréjol, se plantea la necesidad de estandarizar procesos de extracción de proteínas, teniendo a la proteómica como el enfoque principal de este estudio, utilizando técnicas y protocolos específicos para determinar la presencia de estrés como parte



de una respuesta molecular, empleando herramientas como el 2D-PAGE o electroforesis bidimensional, cuyo objetivo principal es separar proteínas por su punto isoeléctrico (1D) y posteriormente separarlas por peso molecular (2D), con la finalidad de identificar y comparar proteínas que reaccionan frente al estrés hídrico (ORTEGA, 2016).

El presente trabajo tiene como objetivo identificar las proteínas involucradas en la respuesta al estrés hídrico en el fréjol común (*Phaseolus vulgaris*) de tipo comercial seleccionado, por medio de un enfoque comparativo de semillas en base a fundamentos de proteómica, dichas proteínas se extraen del endospermo y para comprobar la presencia de proteínas se realiza una electroforesis unidimensional.

Después de identificar las proteínas se ejecuta su separación en base al protocolo de Isoelectroenfoque utilizando tiras de acetato, las mismas que presentan un pH de 3-10 para posteriormente pasar a la segunda dimensión con la ayuda de geles elaborados con poliacrilamida en una electroforesis de tipo bidimensional(2D); las variedades seleccionadas para este estudio son: INIAP 482 AFROAND, INIAP 473, INIAP 474, TM 277, SUG 8, REM 5, FOT 61, ICTAJU Y DURO BLANCO.

## **1.1 Descripción del problema**

El estrés abiótico es un factor que afecta al 60% de la producción mundial de cultivos ( Grant, 2012), y en lo referente a la producción de fréjol el mismo reduce la producción a un valor de menos de 900 Kg por hectárea (Singh, 2001).

El estrés hídrico es un tipo de estrés abiótico que genera en las plantas diversas reacciones que van desde la alteración externa en la percepción fisiológica hasta cambios complejos en la expresión de los genes, transcriptoma vegetal, proteoma y metaboloma que resultan en la variación del metabolismo y de redes reguladoras involucradas en proteger a las células de los efectos dañinos del estrés. (Kosová, Vítámvás, Prasil, & Renaut, 2011).

En el fréjol común se estima que la sequía(el cual es el factor determinante para que se genere estrés hídrico), es el segundo factor limitante al cual es susceptible, limitando así su rendimiento después de las enfermedades, adicional a esto (Polón Pérez, Miranda Caballero, Ramírez Arrebato, & Maqueira López, 2014) , determinaron que el crecimiento

de vainas y semillas así como su altura y diámetro es mayor cuando los cultivos no padecen de estrés hídrico en su ciclo vegetativo.

En Ecuador se considera que de un total de 105,127 hectáreas sembradas de Frejol común se obtiene una cosecha de 89,789 hectáreas en grano seco (Ortega, 2016), siendo la leguminosa con mayor superficie de cultivo en el territorio y que genera un valor económico alto mediado por el consumo en la canasta básica familiar. En el año 2017 el precio del quintal tuvo un aumento del 10% respecto al año 2016 (Banco Central del Ecuador, 2018), dando así evidencias de que su producción favorece a mantener y mejorar la situación económica del país, por lo tanto, es indispensable mantener o mejorar los niveles de producción de forma óptima.

En base a la importancia económica y alimenticia que representa el consumo y producción de frejol común En Ecuador, es necesario realizar un análisis exhaustivo de sus características a nivel molecular sea este genético y bioquímico, con la finalidad de identificar las características que le permitan responder de forma distinta a estímulos tan complejos como el estrés hídrico; para posteriormente adecuar y mejorar los métodos de producción de esta leguminosa.

## **1.2 Justificación del problema**

Debido a que el Frejol común es una leguminosa que cuenta con diversas propiedades a nivel nutricional, económico y preservación de suelos de cultivo por su capacidad de fijar nitrógeno, el identificar las proteínas que responden al estrés hídrico por medio de técnicas de proteómica nos permitirá tener una perspectiva de la situación actual de los cultivos, en base a las diferentes variedades seleccionadas, para a futuro poder elaborar un banco de datos proporcionado por los resultados obtenidos en las variedades analizadas y de esta forma definir a las más calificadas para el cultivo en estas condiciones de estrés.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo General**

Determinar los patrones de expresión de proteínas de estrés hídrico en nueve variedades fréjol común (*Phaseolus vulgaris*).

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Separar las proteínas de las variedades de frejol seleccionadas.
- Identificar las proteínas que se expresan en estrés hídrico en las variedades seleccionadas de frejol común.

## **1.4 Marco teórico**

### **1.4.1 Generalidades del Fréjol común (*Phaseolus vulgaris*)**

El frejol común (*Phaseolus vulgaris*) es una leguminosa con amplio consumo en América latina y África meridional, se desarrolla en climas cálidos y templados los cuales a su vez presentan condiciones variables que han permitido se generen diversos cambios genotípicos y fenotípicos que resultan en diversas variedades. Es además un grano con gran cantidad de proteínas en su composición debido a que pertenece a la familia *Fabaceae* la cual se caracteriza por presentar altos contenidos de proteína que van desde el 20 al 46% de en su composición, son también una fuente de carbohidratos, lípidos micro y macronutrientes indispensables para la alimentación. El valor económico que representa es alto debido a que es una opción económica en comparación a fuentes de proteína de origen animal, asimismo; es una fuente potencial de fijación de nitrógeno lo cual lo provee de un uso secundario como abono.

Las proteínas con mayor cantidad en su composición son tipo albumina y la globulina (Montoya, Lallès, Beebe, & Leterme, 2010), las cuales son una pieza clave en los diferentes procesos que se generan a lo largo de los sistemas sanguíneo e inmunológico en humanos; según (Ulloa , Ulloa, Ramírez , & Ulloa , 2011) la cantidad de aminoácidos presentes en las proteínas incluyen a la lisina, fenilalanina y tirosina en mayor cantidad, siendo los aminoácidos azufrados metionina y cisteína algo deficientes en la composición; Es sabido además que los granos de fréjol cocidos presentan una calidad de 70% en su composición de aminoácidos en comparación a una proteína de origen animal vista desde un porcentaje del 100%.

### **1.4.2 Calidad nutricional**

Las leguminosas poseen una alta cantidad de proteínas, las cuales si bien son menores en comparación a las de origen animal presentan la capacidad de ser altamente solubles y como característica adicional debido a su bajo contenido de lípidos generan beneficios

en la salud cardiovascular que incluyen el bloqueo de enzimas que elevan los niveles de presión arterial ( Vaz Patto, y otros, 2015).

En los granos de fréjol común la cantidad de nutrientes presente además de las proteínas son: Hierro, Zinc, Calcio, Potasio, Magnesio los cuales son micronutrientes esenciales en la dieta; contienen también un alto contenido de fibra y bajo índice glucémico lo cual los convierte en un sustituto ideal de diferentes tipos de cereal en caso de padecer enfermedades que pueden verse agravadas por su consumo como la diabetes; como componente nutricional adicional los granos de fréjol contienen compuestos poli fenólicos que cumplen el rol de antioxidantes.

Una de las características nutricionales que caracteriza a las variedades de fréjol es la presencia de compuestos denominados anti nutrientes; cuya particularidad es la dificultad de digestión que generan en el aparato digestivo; estos anti nutrientes incluyen inhibidores de proteasas y lectinas en mayor cantidad y son reducidos en cierta parte al momento de cocer los granos. ( Messina, 2014).

### **1.4.3 Escenario del Fréjol común (*Phaseolus vulgaris*) En Ecuador.**

El fréjol En Ecuador forma parte fundamental en la alimentación y gastronomía de sus habitantes, siendo además la opción de aporte de proteínas y carbohidratos de fácil acceso respecto a las de origen animal, debido a que en muchos casos los niveles de ingreso económico no les permiten acceder a opciones de mayor costo.

En Ecuador la extensión de esta leguminosa se da mayoritariamente en la región insular con la presencia de dos tipos, los cuales se denominan voluble o trepador y arbustivo; el denominado voluble o trepador se asocia a otros cultivos para su crecimiento, generalmente el maíz y el de carácter arbustivo se encuentra mayoritariamente en forma de monocultivo; estas características permiten darle valor nutricional y poco abrasivo a la tierra en la cual se siembra debido a que impulsan al desarrollo de sistemas de producción sostenible al darse en períodos determinados de sembrado.

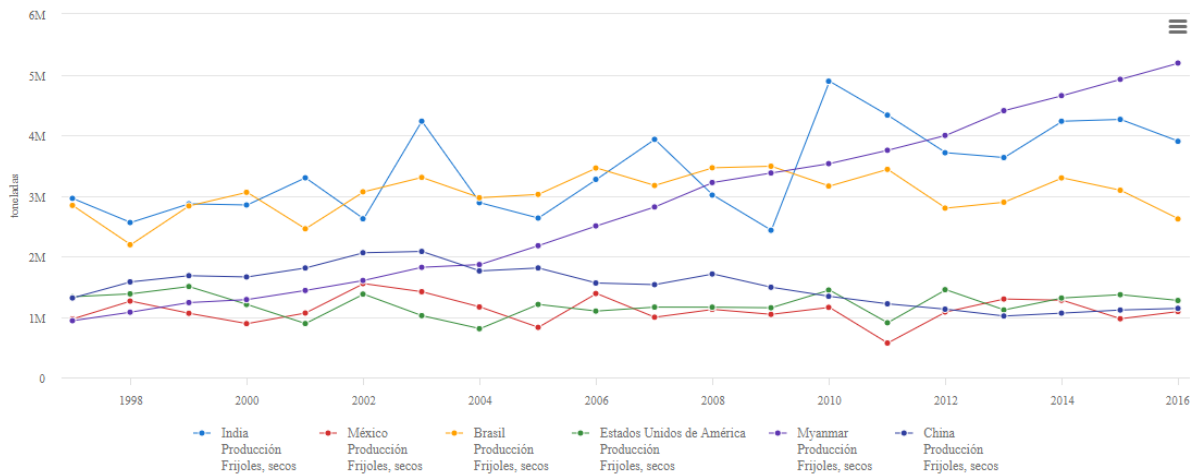
Su principal función en el desarrollo de la economía del país es generar ingresos económicos en las distintas escalas de producción mediada por los agricultores con la finalidad de satisfacer una demanda en el mercado externa e interna.

Actualmente es el INIAP (Instituto nacional de investigaciones agropecuarias), es el establecimiento de carácter público que se encarga de suministrar información acerca de esta leguminosa, la cual abarca su comportamiento económico y rendimiento de producción en base a investigaciones que permiten mejorar la calidad de producción.

#### **1.4.4 Producción y consumo mundial de fréjol común (*Phaseolus vulgaris*)**

A nivel internacional el consumo per cápita de esta especie se ha mantenido estable teniendo una concentración mayor en determinados países de América y África, también viéndose reflejado en Europa y Asia, sin embargo, en años recientes, en algunos países Euroasiáticos se ha visto reducido y reemplazado por otros productos, teniendo como consecuencia un consumo de 2 kg, mientras en países como Nicaragua, Brasil y México se obtienen valores de 18,6, 16,2 y 11 kg respectivamente, en cuanto a Estados Unidos dado su 11% de población hispana el consumo de frejol presenta un valor per cápita de 2,9 kg (Morales-Abarca, 2018), y va en aumento dada la creciente población de origen latino. En consecuencia, se estima un valor global de alrededor de 17 millones de toneladas, una alta concentración que iguala a la producción. Para el 2016 la FIRA (Fidecomisos Instituidos en Relación con la Agricultura) estableció los 5 países que participan en conjunto con el 57.7% del consumo mundial, como son India (24.7%), Brasil (19%), Estados Unidos (5.5%), México (5.3%) y Tanzania (5.5%) (FAO, 2016).

En cuanto a la producción, desde el 2003 al 2014 ha ido en aumento, creciendo a una tasa promedio anual de 1.6%, con 25.1 millones de toneladas. Entre los mayores productores que destacaron en el 2015 tenemos a Myanmar, Tanzania, Estados Unidos, China y Brasil cuyo rendimiento promedio mundial de frijol se ubicó en 0,83 ton/ha, valor que supero el promedio anual mundial, mientras que en México y la India hubo disminuciones considerables, de estos productores en los últimos años se determinaron a India y Brasil como los mayores consumidores concentrando valores de 23,2 y 19,3% respectivamente, dejando a México y Estados Unidos con el 7.3% y 6.1%. (Morales-Abarca, 2018).



**Figura 1: Producción Mundial 1998 – 2016 de los 6 países más destacados a nivel de producción. Fuente: (FAO, 2016)**

### 1.4.5 Producción y consumo de (*Phaseolus vulgaris*) en Ecuador.

En Ecuador, el frejol común es conocido como la leguminosa más apetecida y de mayor consumo luego de los cereales, ocupa el primer lugar en producción por lo que el área que se utiliza para su cultivo es extensa superando incluso los 50.000 ha., dada su amplia diversidad por su gran distribución existen hasta la actualidad alrededor de 50 especies de frejol conocidas.

Esta leguminosa es importante en la dieta de todos los ecuatorianos y se la consume en dos estados ya sea en grano seco o de grano tierno, siendo esta última la que mayormente es cosechada.

En el 2015 la producción nacional presentó un aumento de 30% en comparación con el año anterior, tomando como valor de su volumen un 23.22 toneladas de frejoles tiernos, y aumentó un 2.60% respecto al 2014 en la especie de frejol seco con un valor de 12.878 ton, mientras que la superficie cosechada se redujo en 1,8% un valor mucho menor a la tasa promedio interanual evaluada durante los últimos 15 años, sin embargo, es importante mencionar que las tendencias de producción varían, registrando los niveles de producción cada año y a las variedades que se están analizando.

Según Salazar analista del Boletín situacional del frejol, las principales provincias productoras de esta leguminosa son Bolívar y Azuay con un porcentaje de 21 y 15% respectivamente para la variable fréjol seco, en cuanto al fréjol tierno las provincias que más destacaron en su productividad fueron Los Ríos (40%), Imbabura (19%), Chimborazo (14%) y Azuay (11%) (Ministerio de Agricultura y Ganadería & Cecilia Salazar, 2015).

A escala nacional en el tercer trimestre del año 2017 la producción tuvo una tasa de variación del 6% (Banco Central Del Ecuador, 2017). Aproximadamente el costo de producción para el cultivo del frejol en este año fue entre USD 1000.00 Y USD 1600.00 sin embargo, la cantidad de gastos que se proporciona al cultivo de fréjol dependerá mayormente de la cantidad y calidad de los insumos adquiridos; de estos costos, entre un 15 - 32% se lo destina a labores culturales, como la mano de obra, esta actividad es importante por lo que requiere mayor inversión puesto que influye en el desarrollo fenológico del cultivo, el resto corresponde al control fitosanitario, a la siembra y a la fertilización, al contrario de la producción del frejol seco que destina su mayor cantidad de costos al control fitosanitario (Ministerio de Agricultura y Ganadería & Cecilia Salazar, 2015).

La diferencia de costos en la producción del frejol tierno y el seco se debe a las adaptaciones de su crecimiento en caso de ser monocultivo, debido a la colocación de estacas, y en caso de ser asociados con la producción del maíz la utilización de la estructura del tallo de maíz como soporte y contribuyendo también al maíz ya que se beneficia por el aporte de Nitrógeno que le provee la leguminosa, creando una interacción de simbiosis entre ambas especies.

#### **1.4.6 Características de las variedades de frejol en Ecuador**

Desde el 2004 mediante diversas investigaciones realizadas por los Comités de Investigación Agrícola Local (CIAL), en compañía del programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos del INIAP, han entregado en su totalidad 11 variedades de esta especie con una notable resistencia a las principales factores que afectan a estos cultivos, especialmente a enfermedades que perjudican en mayor medida la estructura fisiológica de la planta; esta diversidad de la especie *Phaseolus vulgaris* se encuentra en la actualidad siendo utilizada por diferentes localidades de la sierra ecuatoriana, teniendo

la mayoría de estas un gran potencial para ser cultivadas en la provincia de Santa Elena (M. Peralta, N. Rodríguez, E. Murillo, & N. Manzón, 2014)

Las características fenotípicas son únicas para cada especie, entre ellas las más destacadas por el tamaño y el color del grano son las variedades rojo moteado, canario, calima negro y blanco panamito, las más apetecidas en el mercado ecuatoriano, (Torres Navarrete et al., 2014), también pueden estar caracterizados simplemente por sus colores blanco, crema, amarillo, rojo, negro, marrón entre otros (ORTEGA, 2016).

Para nuestro estudio investigativo se han utilizado 9 variedades de frejoles, las cuales son: INIAP 482 AFROANDINO, INIAP 473, INIAP 474, TM 277, SUG 8, REM 5, FOT 61, ICTAJU Y DURO BLANCO, con las siguientes características



**Figura 2: Variedades de frejoles (*Phaseolus vulgaris*)**

**Tablas 1 - 9: Características Principales de las variedades INIAP 482, 473, 474, TM 277, SUG 8, REM 5, FOT 61, ICTAJU, DURO BLANCO (M. Peralta et al., 2014)**



**Tabla 1-1: INIAP 482 AFROAND**

<b>CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y AGRÓNOMAS</b>	
<b>Tipo</b>	Arbustivo
<b>Tamaño de grano</b>	Pequeño
<b>Color de la flor</b>	Lila
<b>Color de grano seco</b>	Negro
<b>Forma del grano</b>	Ovalado
<b>Peso de 100 granos</b>	18 g
<b>Días a floración y la cosecha en seco</b>	55 y 122 respectivamente
<b>Zona de cultivo (Adaptación)</b>	Carchi, Imbabura, Chimborazo y Santa Elena (1000 a 2200 m)
<b>Factores bióticos</b>	Susceptible a la roya
<b>Rendimiento promedio</b>	1894 kg por hectárea

**Tabla 1-2: INIAP 473**

<b>CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y AGRÓNOMAS</b>	
<b>Tipo</b>	Arbustivo
<b>Tamaño de grano</b>	Grande
<b>Color de la flor</b>	Rosado pastel
<b>Color de grano seco /Tierno</b>	Rojo / Rosado
<b>Forma del grano</b>	Arriñonado
<b>Peso de 100 granos</b>	86 a 104 g
<b>Días a floración y la cosecha en seco</b>	32 a 36 y 80 a 90 respectivamente
<b>Zona de cultivo (Adaptación)</b>	Carchi, Imbabura, Chimborazo
<b>Factores bióticos</b>	Roya, mancha angular, mancha gris, cenicilla, virus del mosaico
<b>Rendimiento Promedio</b>	3884 kg por hectárea

**Tabla 1-3: INIAP 474 -DORALISA**

<b>CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y AGRÓNOMAS</b>	
<b>Tipo</b>	Arbustivo
<b>Tamaño de grano</b>	Grande
<b>Color de la flor</b>	Blanca
<b>Color de grano seco</b>	Rojo Moteado
<b>Forma del grano</b>	Arriñonado
<b>Peso de 100 granos</b>	48 g
<b>Días a floración y la cosecha en tierno/ seco</b>	30 -35 y 60 -70; 85 - 90 respectivamente
<b>Zona de cultivo (Adaptación)</b>	Cuenca baja del rio Guayas y zona de Bucay
<b>Factores bióticos</b>	Tolerancia a Mariquita, Cenicilla y Roya
<b>Rendimiento promedio</b>	3859 kg/ha en tierno y 2226 kg/ha en seco

**Tabla 1-4: TM 277**

<b>CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y AGRÓNOMAS</b>	
<b>Tipo</b>	Arbustivo
<b>Tamaño de grano</b>	Pequeño
<b>Color de grano</b>	Café claro
<b>Forma del grano</b>	Lisa ovalada
<b>Peso de 100 granos</b>	27.59
<b>Días a floración y la cosecha en seco</b>	34 y 82
<b>Factores bióticos</b>	Enfermedades
<b>Rendimiento promedio</b>	1427 kg/ha

**Tabla 1-5: SUG 8**

<b>CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y AGRÓNOMAS</b>	
<b>Tipo</b>	Arbustivos
<b>Tamaño de grano</b>	Pequeño
<b>Color de grano</b>	Rojo
<b>Forma del grano</b>	Redondeada

<b>Peso de 100 granos</b>	17.45 g
<b>Días a floración y la cosecha en seco</b>	40 y 82
<b>Zona de cultivo (Adaptación)</b>	Yaguachi, provincia del Guayas
<b>Rendimiento promedio</b>	2276 kg/ha

**Tabla 1-6:REM 5**

<b>CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y AGRÓNOMAS</b>	
<b>Tipo</b>	Arbustivo
<b>Tamaño de grano</b>	Pequeño
<b>Color de grano</b>	Blanco
<b>Forma del grano</b>	Redondeada lisa
<b>Peso de 100 granos</b>	21.04
<b>Días a floración y la cosecha en seco</b>	40 y 83
<b>Zona de cultivo (Adaptación)</b>	Provincia del Guayas, valle del chota
<b>Rendimiento promedio</b>	1139 kg/ha

**Tabla 1-7: FOT 61**

<b>CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y AGRÓNOMAS</b>	
<b>Tipo</b>	Arbustivo
<b>Tamaño de grano</b>	Pequeño
<b>Color de grano</b>	Rojo
<b>Forma del grano</b>	Forma cilíndrica reniforme
<b>Peso de 100 granos</b>	24.66 g
<b>Días a floración y la cosecha en seco</b>	40 y 82
<b>Zona de cultivo (Adaptación)</b>	Taura, Provincia del Guayas
<b>Rendimiento promedio</b>	1510 kg/ha

**Tabla 1-8: ICTAJU**

<b>CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y AGRÓNOMAS</b>	
<b>Tipo</b>	Arbustivo

<b>Tamaño de grano</b>	Pequeño
<b>Color de grano</b>	Café oscuro
<b>Forma del grano</b>	Arriñonada
<b>Peso de 100 granos</b>	13,53 g
<b>Días a floración y la cosecha en seco</b>	34 y 82
<b>Zona de cultivo (Adaptación)</b>	Yaguachi, Guayas
<b>Rendimiento promedio</b>	597 kg/ ha

**Tabla 1-9: DURO BLANCO**

<b>CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y AGRÓNOMAS</b>	
<b>Tipo</b>	Arbustivo
<b>Tamaño de grano</b>	Pequeño
<b>Color de grano</b>	Blanco
<b>Forma del grano</b>	Lisa Alargada
<b>Peso de 100 granos</b>	22.24 g
<b>Días a floración y la cosecha en seco</b>	40 y 83
<b>Rendimiento promedio</b>	942 kg/ ha

#### **1.4.7 Factores que afectan a la producción del fréjol común (*Phaseolus vulgaris*)**

La producción del fréjol se ha visto afectada por una serie de factores bióticos y abióticos. Dentro de los factores abióticos que mayor problema presentan están la temperatura y la disponibilidad de agua, puesto que en los últimos años se ha visto modificado por los cambios climáticos presentes en nuestro planeta. Mientras que los factores bióticos son provocados por patógenos que afectan directamente a la planta, provocando cambios en su composición morfológica, incluyendo disminución de tamaño de hojas, de tallo, además cambios fisiológicos en la síntesis de proteínas, respiración, fotosíntesis y distribución de nutrientes (Quintero & Quijano, n.d.).

América Latina y África son continentes que más han sido perjudicados a causa de estos problemas, ya que la producción total presenta considerable disminución debido a los

microclimas con poca agua a los cuales son sometidos los cultivos. (Quintero & Quijano, s. f.)

#### **1.4.8 Tipos de suelo de la Costa Ecuatoriana y su uso agrícola**

Ecuador se caracteriza principalmente por la riqueza y abundancia de sus recursos naturales, entre ellos se destacan los suelos que constituyen un componente importante, en el desarrollo de la producción agrícola (MANTILLA, s. f.).

En la actualidad existen en nuestro país, un sin número de variedades de perfiles edáficos, cuyas particularidades varían dependiendo de las condiciones y componentes del lugar donde se encuentre, constituyendo así en la región Costa, los suelos aluviales o planos costeros; en la región Sierra, suelos sobre cenizas volcánicas o suelos de tierras altas y en la Amazonía los suelos amazónicos.

Los suelos de plano costero abarcan toda la zona costera del país, ocupando 46 mil km<sup>2</sup> de extensión, se caracterizan por su relieve plano y por ser suelos con muy poco contenido de minerales, entre ellos encontramos a los vertisoles, suelos de color negro, moderadamente profundos, con minerales poco desarrollados y alto contenido de arcilla, se encuentra cercano a zonas aluviales, con alta saturación de bases y de difícil laboreo, sin embargo, es fértil para el cultivo de algunas especies, generalmente para la producción de arroz, maíz y soya.

Alfisoles constituyen el 3% de la costa ecuatoriana, son suelos minerales con horizontes claros sobre una capa de arcilla, de buen desarrollo pedogenético (eluviación, iluviación), generalmente se encuentra en zonas húmedas, importantes en la producción agrícola por su mediana-alta fertilidad en los suelos (ULLOA, 2015).

Entisoles son suelos superficiales de material mineral, producto de erosiones, aportes aluviales o por acción antrópica, constituyen el 13% compartida entre la región litoral y Andina, son los más apreciados en esta zona, ya que es utilizado comúnmente para la producción de cacao, banano, café y frutas; que son productos de mayor exportación (ULLOA, 2015).

Otro suelo de importancia en la costa ecuatoriana son los aridisoles que constituyen el 1% de su extensión, son suelos minerales de baja cantidad de materia orgánica y meteorización, de poca vegetación, sin embargo, a lo largo del tiempo se ha ido modificando a través de riego estatales, que incorporan áreas para cultivos de mango, cítricos y mangos productos de gran relevancia en la exportación internacional. Existen

otros tipos de suelos de origen franco arenosos como las llanuras aluviales que son utilizados para el cultivo de la caña de azúcar entre otros, sin embargo, en la actualidad, estos suelos se ven afectados por las limitaciones hídricas que se presentan por el continuo cambio que está afectando al microclima de la región (ULLOA, 2015).

En la Región Sierra, se encuentran ejemplares como suelos Andisoles desarrollados generalmente a partir de cenizas volcánicas con alta fijación de fósforo y buenas condiciones de fertilidad, ubicadas en zonas altas y húmedas ideales para el cultivo de papas y cereales, también encontramos a los Inseptisoles constituyente al 43% de la zona del Ecuador, distribuidas por el sur de la sierra ecuatoriana y Amazonía, son suelos minerales muy rico en CO, de alta fertilidad con gran aptitud agrícola.

Los Molisoles son también de gran importancia para el cultivo de hortalizas, maíz y pastizales para la actividad agropecuaria, el uso de estos suelos es exclusivo de la región Interandina.

La región amazónica es caracterizada por poseer suelos rojos denominados oxisoles, de muy poca fertilidad y alto contenido de metales pesados, se encuentran cubiertos por vegetación primaria y trabajan en conjunto con pastizales cultivados en la zona; esta región debido a su clima húmedo- cálido y a los componentes que constituyen sus tierras presentan suelos forestales y mineros (ULLOA, 2015).

Por otro lado, la mayor parte de los suelos En Ecuador son propicios para la producción de diferentes cultivos como el banano, cacao, y cereales, que son los más cotizados a nivel internacional. Para lo frejoles, al contrario, se ha visto en su mayoría se cultivado en la Sierra Ecuatoriana hasta el 2004, en donde lograron lanzar al mercado variedades de semillas resistentes a condiciones más cálidas y a enfermedades que se producen en estos ambientes, hoy en día existen más de 11 variedades con estas propiedades de resistencia genética, siendo adaptadas a su cultivo en provincias como Santa Elena, Los Ríos y Guayas en la zona de Yaguachi (M. Peralta et al., 2014). Los suelos de estos lugares por lo general pertenecen a la categoría de suelos francos y franco-arcillosos, siendo participes de un buen sistema de drenaje, no obstante, en los últimos años se han visto afectados por la concentración de sales, perjudicando a los cultivos llevándole a una condición de estrés hídrico, siendo como resultado pérdidas de rendimiento y calidad del producto. (Briones & Proaño, 2008)

#### **1.4.9 Importancia de la fijación de nitrógeno en suelos por acción de las leguminosas**

El nitrógeno es uno de los elementos constitutivos de los seres vivos más importantes debido a que es un componente estructural en los aminoácidos los cuales a su vez son moléculas que conforman a las proteínas.

Se estima que la atmosfera posee alrededor de  $10^{15}$  toneladas de nitrógeno molecular gaseoso y este al pasar por su ciclo genera la transformación de  $3 \times 10^9$  toneladas al año (Postgate, 1983). En los suelos destinados a la agricultura la demanda de este compuesto tanto es sus formas orgánicas como inorgánicas se debe ajustar a los diferentes cultivos vegetales y por ende en la actualidad se ha recurrido al uso de fertilizantes industriales como opción para tratar el suelo, este tipo de compuestos ha generado un cambio en la de fijación orgánica de nitrógeno en el suelo ejercida por las bacterias y plantas.

El uso de fertilizantes industriales con altas cantidades de nitrógeno se usa actualmente como recurso para suplir la demanda de grandes cultivos, pero a la par causa daños ecosistémicos severos a largo plazo que incluyen la emisión de gases de efecto invernadero, cambio de las propiedades fisicoquímicas del suelo y la contaminación del agua subterránea. (Zhao, Zeng, He, Chen, & Wang, 2015).

La leguminosas presentan la particularidad de ser elementos ecosistémicos fijadores de nitrógeno en el suelo por naturaleza, característica que genera grandes resultados con el aumento de este elemento hasta en 200 millones de toneladas al año ( Peoples, y otros, 2009), la fijación de nitrógeno atmosférico en amoníaco ocurre gracias a una interacción simbiótica entre esta familia vegetal y bacterias del género *Rhizobium*, quienes se encuentran formando nódulos en las raíces debido a procesos de deformación en sus diversas estructuras como resultado de la penetración de la bacteria a través de los pelos apicales. (Beringer, Brewin, Johnston, Schulman, & Hopwood, 1979).

El proceso de simbiosis da como resultado la obtención de carbohidratos para las bacterias por parte de la plantas las cuales a su vez obtienen la capacidad de poder fijar nitrógeno por medio de la producción de glutamina sintetasa, enzima clave para este proceso fisiológico. ( Biswas & Gresshoff, 2014), la interacción general por parte de ambos componentes biológicos incluye señales de reconocimiento enviadas por las

leguminosas a las bacterias por medio de la producción de lectinas; es importante recalcar que ambos componentes simbióticos son incapaces de fijar nitrógeno por su cuenta; el proceso de fijación de nitrógeno ocurre en los nódulos formados en la raíz donde las bacterias del género *Rhizobium* encuentran las condiciones necesarias para la activación de su enzima nitrogenasa la cual responde a cantidades específicas de oxígeno, adicionalmente la producción de una enzima de origen compartido por parte de ambos componentes denominada leghemoglobina juega un rol crucial en la actividad de la nitrogenasa regulando la cantidad de oxígeno producida en los nódulos para de esta forma ejecutar el proceso fisiológico de la fijación del nitrógeno de forma óptima. (Beringer, Brewin, Johnston, Schulman, & Hopwood, 1979).

Un estudio realizado por (Wu, Liu, Tian Zhi-Hua Shi, & Shi, 2016) donde se calculó el aumento de biomasa sobre y debajo del suelo luego de ser tratado con cultivos de leguminosas, reportó que este aumento se produjo por medio de tres mecanismos clave, que incluyeron: el aumento de la habilidad para fijar nitrógeno por parte del suelo debido a la acción de las leguminosas cultivadas, la relación positiva entre especies no leguminosas y leguminosas siempre y cuando exista una diferenciación de nicho y un aumento en la diversidad y riqueza de especies vegetales.

El trabajo presentado por (Génard, Etienne, Laîné, Yvin, & Diquélou, 2016), en el cual se cuantifica la transferencia de nitrógeno por parte de tres leguminosas lupino (*Lupinus albus* L), trébol encarnado (*Trifolium incarnatum*) y veza (*Vicia sativa* L.) a un cultivo de canola (*Brassica napus*); demuestra que el aporte de nitrógeno por parte de las leguminosas a especies no fijadoras de nitrógeno depende en su mayoría de la competencia por nutrientes respecto a la divergencia del nicho que ocupan, siendo en este estudio la integración trébol-canola y lupino-canola las que presentan mejores resultados con relación al crecimiento y aporte de nitrógeno a la canola, ya que ambas leguminosas cumplen el rol de donadores de nitrógeno a las semillas de canola sin verse afectadas en su crecimiento.

En el fréjol común (*Phaseolus vulgaris*) los estudios realizados por (Polania, Poschenrieder, Rao, & Beebe, 2016) en el cual probaron la capacidad que presenta esta



especie para la fijación de nitrógeno en condiciones de estrés por sequía por medio del método de fijación natural del isótopo de nitrógeno quince, demostraron que si bien su capacidad se ve reducida drásticamente; cuatro especies modificadas de las treinta y seis evaluadas se vieron menos afectadas siendo identificadas como líneas potenciales para el desarrollo de modificaciones que permitan reducir el impacto de este factor de estrés en el proceso de fijación de nitrógeno.

#### **1.4.10 Tipos de estrés en las plantas**

El estrés es una reacción fisiológica generada en los seres vivos debido a diversos factores y cuya respuesta se ve reflejada con la afección de los diferentes mecanismos de defensa.

Los factores que pueden intervenir en la expresión del estrés en los organismos pueden ser de tipo biótico y abiótico y generalmente la respuesta da como resultado el deterioro de su sistema inmune por medio de la interacción de estos componentes; en las plantas la manifestación del estrés involucra cambios en la fisiología que se traducen a nuevas interacciones de tipo planta-plaga lo cual resulta en la conversión de patógenos con menor impacto en una amenaza potencial impidiendo un desarrollo adecuado. ( Scherm & Coakley, 2003) citado en (Pandey, Irulappan, Bagavathiannan, & Senthil-Kumar, 2017).

En relación con los diferentes factores que pueden interactuar para producir estrés, la tensión generada en los vegetales puede ser de tipo: individual, múltiple individual y combinado. El estrés único se da cuando un solo componente de estrés impide el desarrollo efectivo de la planta, el estrés múltiple sin embargo incluye dos o más factores y los mismos pueden presentarse en diferentes periodos (individual múltiple) o a su vez en escalas de tiempo similares estableciendo la superposición entre ellos(múltiple combinado).(Pandey et al., 2017); no obstante si los factores que causan estrés desaparecen, existe la posibilidad de facilitar el proceso de mejoría en la planta dependiendo del nivel de tolerancia y la extensión de estos elementos a lo largo de una etapa de desarrollo.

#### **1.4.11 Estrés biótico en las plantas**

El estrés biótico es el tipo de estrés que se presenta por la influencia de otros seres vivos, esto engloba a organismos desde una escala microscópica a macroscópica; entre los cuales se incluyen:

Herbívoros (por efecto de alimentación), otras plantas (por competencia intra e interespecífica entre especies vegetales), Bacterias, hongos y nemátodos (patógenos estrictos) (Ortega, 2016).

Estos componentes vivos se encuentran relacionados directamente con los factores de tipo abiótico, lo cual se traduce a que la acción de los patógenos sobre las estructuras fisiológicas de una determinada especie vegetal se ve facilitada por distintas variaciones que se efectúan en el ambiente por acción del cambio climático; asimismo la competencia en especies vegetales competidoras presenta variaciones en base a ventajas fisiológicas ante la exposición a las variaciones efectuadas en el ambiente.

(Lamichhane & Venturi, 2015), establecen que a diferencia de las patologías dadas por mono especies patógenas las cuales se expresan en los mamíferos, en las plantas es posible que la infección por más de un patógeno esté presente; en muchos casos la infección de un solo patógeno puede no dar síntomas graves de una enfermedad en contraste cuando se genera una coinfección en conjunto.

Esto deja en evidencia que una manifestación crónica de determinadas enfermedades esta moderada por la sinergia de los patógenos, ejemplos claros de estas manifestaciones son la enfermedad de la podredumbre del pie y la corona causada por cuatro especies de *Fusarium* distintas como se establece en (Kuzdraliński et al., 2014) citado en(Lamichhane & Venturi, 2015) .

#### **1.4.12 Estrés abiótico en las plantas**

El estrés abiótico en las plantas se define como cualquier condición ambiental a parte de la acción de otros organismos que reducen su crecimiento, supervivencia y la fecundidad, dichas condiciones incluyen principalmente los siguientes factores:

Alta salinidad del suelo, sequía, inundaciones, temperaturas extremas (altas o bajas), variaciones en el nivel de luz.

La sequía y la salinización son factores que se manifiestan como estrés a nivel osmótico causando deshidratación celular y mecanismos de respuesta fisiológicos, estos mecanismos incluyen un control óptimo del transporte de agua y homeostasis iónica: activación e inactivación de acuaporinas y sistema de transporte iónico, actuando sobre la membrana plasmática de las células; todo esto con la finalidad de reducir la pérdida celular de agua y la acumulación de iones tóxicos en las vacuolas ( Wang, Vinocur, & Altman, 2014). El mecanismo de defensa empleado por las plantas para evitar el estrés osmótico se ve favorecido por la presencia de la prolina, un aminoácido que se cree protege la estructura de la membrana manteniendo el estado de oxido-reducción interno al secuestrar especies reactivas de oxígeno(ROS) los cuales son generalmente iones de oxígeno y radicales libres (Johnová, Skalák, Saiz-Fernández, & Brzobohatý, 2016). Por su parte el estrés oxidativo de las plantas se manifiesta en condiciones de altas temperaturas, salinidad y sequía y como resultado se produce la desnaturalización de proteínas funcionales y estructurales (Smirnoff, 1998)citado en ( Wang, Vinocur, & Altman, 2014).

(Negrão, Schmöckel, & Tester, 2017) mencionan que el aumento de la salinidad en el suelo genera estrés en las plantas mediante dos etapas: en la primera etapa las reacciones de las plantas incluyen un cierre las estomas evitando la expansión de las hojas; esto es debido a que las plantas se encuentran detectando la cantidad de sales que está ingresando; generalmente esta inspección fisiológica incluye principalmente iones de Na<sup>+</sup>.

La segunda etapa involucra el cambio y acumulación de iones a nivel fisiológico, primero expresándose en las hojas viejas con concentraciones tóxicas que causan su deterioro hasta llegar a las hojas más jóvenes causando al final la senescencia y posible muerte de las plantas, debido a que las concentraciones de iones van en aumento este proceso se da períodos de tiempo más largos que pueden tomar días a semanas; la principal característica visual ante este tipo de estrés es el color amarillo de las hojas.

La temperatura es uno de los factores principales en el desarrollo de las plantas debido a que son organismos poiquilotérmicos lo que significa que responden a los cambios de

temperatura en el ambiente con cambios en su fisiología al presentarse variaciones de este factor.

El principal efecto que generan las altas temperaturas en las plantas es la abrasión de hojas y tallos, inhibición del crecimiento de la raíz y daño de la fruta; a nivel molecular el metabolismo de las proteínas, la estructura de la membrana celular y la fotosíntesis se ven afectadas, dando como respuesta la producción acelerada de proteínas de choque térmico (HSPs) las cuales responden a nivel celular como reductores del daño en los organelos, realizando además funciones de plegado de proteínas y facilitando los procesos de recuperación en las diferentes lesiones generadas.(Bita & Gerats, 2013).

Respecto a la presencia de bajas temperaturas como factor de estrés, los efectos que se manifiestan en las plantas son similares a los de deshidratación celular por sequía y salinidad incentivando al cierre de los estomas mediado por la producción de ácido abscísico (ABA), lo cual termina en una reducción de la captación de CO<sub>2</sub> e inhibición de la fotosíntesis. (Johnová, Skalak, Saiz-Fernández, & Brzobohatý, 2016).

El estrés por inundación en las plantas se produce debido a que la cantidad de agua en el suelo deja sumergidas parcial o totalmente las plantas sin dar paso a una correcta asimilación del oxígeno molecular en meristemas y raíces, a medida que el oxígeno se reduce en el ambiente produce condiciones de hipoxia en los diferentes tejidos e impulsa a la producción de etileno que tiene como consecuencia la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células epidérmicas, a medida que estos compuestos aumentan conducen a la muerte celular programa de los tejidos y la inhibición de la raíz. ( Loreti, Veen, & Perata, 2016).

A pesar de que la luz es uno de los principales factores que permiten el desarrollo óptimo de las plantas, un exceso o inhibición puede dar paso a alteraciones de crecimiento, este tipo de estrés depende de la fluencia, tiempo de exposición y si las plantas presentan una aclimatación previa a la luz. La cantidad de luz UV-B inducida en niveles ligeramente estresantes en las plantas produce daño en el ADN, especies reactivas de oxígeno(ROS), y deterioro de la resistencia a patógenos, El aumento de la radiación de luz UV-B se ve favorecido por la reducción de la capa de ozono en la atmosfera, permitiendo la entrada de los rayos UV-B con mayor intensidad(Müller-Xing, Xing, & Goodrich, 2014).

En caso de que las plantas sean expuestas a bajas cantidades de radiación UV-B lo que sucede es una aclimatación condicionada que favorecerá a una alteración de los mecanismos de defensa cuando las condiciones ambientales sean modificadas, adicional a esto la baja exposición de UV-B produce cambios a nivel genético y en su morfología sin haber sido sometidas a un factor adicional de estrés.(Hectors, Prinsen, De Coen, Jansen, & Guisez, 2007) citado en (Müller-Xing et al., 2014) .

#### **1.4.13 Proteínas expresadas antes el estrés en las plantas**

Las diversas proteínas que se expresan antes los estímulos de estrés se caracterizan por estar involucradas en procesos de embriogénesis tardía denominadas LEA en su acrónimo, este grupo incluye un tipo de proteínas denominadas dehidrinas, las dehidrinas se presentan en la última etapa del desarrollo de semillas evitando la desecación de las mismas; estas proteínas son una respuesta adaptativa a la falta de agua manteniendo las estructuras celulares y mejorando los efectos del estrés(Gebeyehu, 2006).

Las proteínas de choque térmico (HSPs) son también un tipo de proteínas que se expresan en condiciones de estrés, generalmente se relaciona con estrés de altas temperaturas; su principal función es permitir el plegamiento de otras proteínas de forma adecuada ante estímulos estresantes de esta naturaleza y evitar su desnaturalización ,protección al ARNm y reparación asistida por chaperoninas post-estrés (Wang, Vinocur, Shoseyov, & Altman, 2004).

#### **1.4.14 Proteínas presentes en semillas de fréjol común (*Phaseolus vulgaris*)**

La mayoría de las proteínas de almacenamiento que componen las semillas de fréjol son de tipo globulina ocupando un 54 a 79% de su composición y albuminas en un 12 a 30%, por otra parte, la presencia de glutelinas y prolaminas también están presentes como parte estructural del endospermo con un porcentaje de 20 a 30% y 2 a 4% en su composición respectivamente (Bollini & Vitale, n.d.).

La faseolina es otra de las proteínas que componen a las semillas de fréjol, esto se da en un valor de 40 a 50% del contenido total de nitrógeno, su presencia permite revelar el grado de diversidad genética en base a un polimorfismo que se ha establecido por medio de complejas características bioquímicas y condiciones climáticas según la zona de cultivo, Se han reportado once tipos de perfil de faseolina distintos con una variación de 45.6 a 54.4 kDa (Salmanowicz, 2001). Estudios han logrado concluir que la diversidad presente en la faseolina se debe a la diversificación de su punto isoeléctrico y la composición de polipéptidos los cuales presentan distintas proporciones en cada molécula, la variación del rango de peso molecular de estas proteínas se encuentra entre 47 a 50 kDa y en su punto isoeléctrico de 5.25 a 5.42 (Bollini & Vitale, s. f.).

Por su parte la legumina es otra de las proteínas de tipo albumina encontradas en las semillas principalmente de leguminosas como es el caso del fréjol, (Derbyshire, Wright, & Boulter, 1976) reportan que esta es la proteína con mayor almacenamiento en granos de soya y habichuelas; además (Natarajan, Pastor-Corrales, Khan, & Garrett, 2013) ha reportado la presencia de puntos de proteína con peso molecular de 69 kDa y un punto isoeléctrico de 5.64 en fréjol común.

Respecto a las proteínas de defensa presentes en las semillas de fréjol, se incluyen a las lectinas e inhibidoras de amilasa; las lectinas son también denominadas Fito hemaglutininas (PHP) y representan alrededor del 10% del total de proteínas en los cotiledones, su principal función es generar respuesta inmune innata, así también como la interacción simbiote con otros organismos ( De Hoff, Brill, & Hirsch, 2009).

(Natarajan, Pastor-Corrales, Khan, & Garrett, 2013) reportaron que el rango de peso molecular y punto isoeléctrico de estas proteínas presentan un rango de 29 a 31 kDa y de 4.83 a 5.80 respectivamente para cada medida; por su parte (Sathe, 2008) reportó variantes en peso molecular que presentan un rango entre 27 a 37kDa de peso molecular.

Entre los inhibidores de proteasa se encuentra los denominados inhibidores Bowman-Birk (BBIs), las cuales son proteínas con un peso molecular de entre 8 a 16 kDa y alto contenido de cisteína; su principal función es la protección ante diferentes patógenos y parásitos.

Respecto a las proteínas que responden al estrés como LEA y HPSs; (Natarajan, Pastor-Corrales, Khan, & Garrett, 2013) reportaron dos dehidrinas con un peso molecular de 26kDa y un punto isoeléctrico de 5.97 y para las proteínas HPSs se encontraron dos tipos con un punto isoeléctrico de aproximadamente 5.28 y un peso molecular de 71 kDa.

# CAPÍTULO 2

## 2 METODOLOGÍA

El presente trabajo tiene como finalidad identificar proteínas que responden al estrés hídrico en nueve variedades de fréjol común (*Phaseolus vulgaris*) ya que dicha leguminosa es un componente de amplio consumo a nivel agrícola En Ecuador y a su vez un recurso que puede proveer de manera natural la fertilización de cultivos debido a su capacidad para fijar nitrógeno en el suelo.

### 2.1 Materiales y Métodos

#### 2.1.1 Extracción de proteínas

La extracción de las proteínas comienza principalmente con una lisis celular, cuyos métodos se basan en la destrucción de los límites celulares u homogenización de tejidos, seguidos de varios pasos de separación y purificación de los componentes celulares a través de diferentes procedimientos físicos y/o químicos, obteniendo como resultado un extracto concentrado de proteínas.

##### 2.1.1.1 Procesamiento de material vegetal

Las 9 variedades de frejoles perteneciente a la especie *Phaseolus vulgaris*, fueron macerados en nitrógeno líquido, posteriormente fueron triturados hasta obtener como resultado un polvo fino.

Para la extracción de proteínas de *P. vulgaris*, se utilizó el método de TCA/FENOL (Pérez Mora, Medhi Jazayeri, Romero, & Melgarejo, 2010). Se utilizó 50 mg de cada una de las variedades, tomando en cuenta que durante todo el protocolo la muestra debe mantenerse en frío.

Se añadió 2 ml de solución 1, TCA 10% Acetona, se lo colocó en el Vórtex seguido de una Inversión, durante 10 segundos y se centrifugó a 4° C a 12000 rpm durante 10 minutos; eliminamos el sobrenadante y recuperamos el pellet. Posteriormente se añadió 2 ml de solución 2, Acetato Amónico 0,1 M en Metanol 80%, en el pellet recuperado, se lo colocó en Vórtex y se centrifugó bajo las mismas condiciones durante 10 min, así mismo se recupera el pellet eliminando el sobrenadante, y se añade la solución 3, Acetona 80%, en donde se lo observó tomar un color blanquecino, se lo sometió al vórtex



y se centrifugó durante 10 min, finalizado esto se toma el producto resultante y se lo deja secar al aire.

Se procedió, luego a trabajar en campana, en donde se añadió a la muestra 600 µL de solución 5, SDS Buffer, se mezcló bien y se añadió la Solución 4 correspondiente a Phenol pH8 Sigma, se mezcló de forma homogénea, se debe tomar en cuenta que al añadir esto se lo debe hacer en relación 1:1; se procedió a centrifugar a 4°C a 12000 rpm durante 10 min.

Una vez culminado se transfirió la parte fenólica a un nuevo tubo y se le añadió 2 mL de Buffer de precipitación y se lo dejó precipitar durante 24 h a -20°C.

Para finalizar con el proceso, se centrifugó en las mismas condiciones trabajadas anteriormente durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se recuperó el pellet, luego se procedió a realizar lavados con Metanol 100% y Acetona al 80% haciendo intermedios de centrifugados a 4°C a 12000 rpm durante 10 min, dejando secar en cada uno de los procesos.

Una vez realizado esto se eliminó el sobrenadante y se lo solubiliza durante 2 h llevándolo al agitador a 4°C y se le añadió de 70 – 100 µL de Medio de solubilización (Urea 7 M, Thiourea 2M, CHAPS 4%, Triton 2%, DTT 100 mM) dependiendo de la cantidad de pellet que se obtuvo.

### **2.1.2 Determinación del contenido de proteína**

El método Bradford es uno de los protocolos más usados para la determinación de proteínas, dado que es rápido y sensible para la cuantificación de cantidades de microgramos de proteínas utilizando el principio de unión proteína- colorante, utilizando al Coomassie Brilliant Blue G-250 para la unión, provocando un cambio en la máxima absorción del colorante que va de 495 a 595 nm siendo este cambio en la absorción, el que se controla obteniendo como resultado, valores de absorbancia y concentración de proteínas (Bradford, 1976).

#### **2.1.2.1 Curva de calibración**

Para la determinación de concentración de proteínas totales que están presentes en una muestra, es necesario la preparación de una curva referencial elaborada a base de una proteína patrón. En nuestro proyecto se utilizó a la albúmina sérica bovina, como muestra de proteína estándar, debido a que presenta una cantidad de pureza del 98% (Balkani, Shamekhi, Raoufinia, Parvan, & Abdolalizadeh, 2016) el cual la hace más factible para

determinar el ajuste de la curva en las concentraciones de las 9 muestras, para esto, se añadió 100 µg de la proteína estándar en 5 ml de agua para la obtención de la solución madre a una concentración de 20 µg/ml, seguidamente se establecieron 7 posibles concentraciones, cada uno con disoluciones diferentes (TABLA 2.1). Esto dio paso para la elaboración de la curva de calibración, que fue realizada en base al método Bradford. Para esto se utilizó una microplaca de 96 pocillos, en el cual se colocó 250 µL de la solución de Bradford más 1 µl de cada una de las disoluciones en los 7 pocillos seleccionados.

CONCENTRACIONES	PROTEINA (µL)	AGUA (µL)
Concentración 0		500
Concentración 2	50	450
Concentración 4	100	400
Concentración 6	150	350
Concentración 8	200	300
Concentración 10	250	250
Concentración 12	300	200
Concentración 14	350	150

**Tabla 2-1: Valores de las disoluciones a diferentes concentraciones. Los 5 valores seleccionados fueron los establecidos para el modelo ajustado.**

Para la lectura de las concentraciones se hizo uso del equipo de lectura de placas con micro-pocillos, utilizando el Software Gen5 1.07, que nos arroja puntos establecidos dependiendo de la concentración de cada disolución, a esto se seleccionó 5 puntos, que fueron los más factibles para el correcto ajuste de un modelo lineal, estableciendo así una curva que se rige de la siguiente fórmula:

$$Y = A * X + B$$

Se presenció además una tabla de valores de concentraciones de las muestras colocadas y el valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ), que nos indica el grado de fiabilidad del modelo ajustado a un conjunto de datos (RODRÍGUEZ, s. f.), en este caso nuestra bondad de ajuste ( $R^2$ ) del modelo fue de 9.8.

### **2.1.2.2 Determinación de Concentración de proteínas en los diferentes extractos de las 9 variedades**

Siguiendo el Método Bradford, una vez realizada la curva de calibración, se procedió a medir la cantidad de proteínas de las 9 variedades de frijoles, por lo que se tomó 1 µl de la muestra y 250 µl de la solución Bradford para cada una de las variedades. Una vez hecho esto, el programa Gen5 1.07 arrojó una tabla con valores de absorbancia y concentración para las 9 muestras.

GEN5 1.07	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Concentración	5,488	4,195	3,611	4,084	4,960	6,916	6,591	3,864	2,554
Absorbancia	1,097	0,933	0,859	0,919	1,03	1,278	1,233	0,891	0,725

**Tabla 2-2: Valores de absorbancia y concentración de las 9 variedades de frejoles (*Phaseolus vulgaris*)**

Estos valores de concentración de proteínas (Tabla 2.2) son necesarias, debido que permite la determinación de la cantidad de proteínas y buffer de rehidratación, Ready Prep (2-D Starter Kit Rehydration/sample buffer-BIORAD), exacta para la rehidratación de tiras, procedimiento que sirve para separar proteínas por su punto isoeléctrico, en un proceso denominado Isoelectroenfoco.

### **2.1.3 Determinación de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE o primera dimensión.**

La técnica SDS page es empleada en proteómica para separar mezclas de proteínas por medio de un componente aniónico conocido como dodecil sulfato sódico (SDS), el cual imparte carga negativa proporcional a la masa molecular de las proteínas, de esta forma se mantiene estáticas a las proteínas en su carga para posteriormente ser sometidas a una migración en base a su peso molecular por medio de geles porosos de poliacrilamida efectuando una electroforesis al gel, a su vez la electroforesis en gel incluye el someter a un campo eléctrico el gel en conjunto con las proteínas de interés. ( Nowakowski, Wobig, & Petering, 2014).

La elaboración del gel se realizó tomando en cuenta diferentes grados de reticulación o porosidad, siendo la primera parte del gel de baja reticulación (4%) y un pH de 6,8 para de esta forma acumular a las proteínas conforme a su densidad, contiguo a este se preparó un gel con reticulación mayor (12%) y un pH de 8.8 a fin de permitir la separación de las proteínas.

Los reactivos y sus cantidades para el proceso de elaboración de los geles se incluyen en la tabla 2.3.

Reactivos	Gel concentrador (STAKING 4%-2ml)	Gel separador(12%-5ml)
Agua	1.558	2.398
40% A/bis	0.200	1.500
1.875 M Tris pH 8.8	-----	1.000
1.875 M Tris pH 6.8	0.200	-----
10% SDS	0.020	0.050
10% AP	0.050	0.050
TEMED	0.005	0.005

**Tabla 2-3: Cantidad de reactivos para la elaboración de geles de poliacrilamida en solución de concentración (4%) y separación (6%).**

En el proceso se utilizaron dos vidrios con diferente espesor y se colocaron en un soporte el cual permite retener los geles hasta que solidifiquen, previo a esto es necesario verificar que el sistema no presente fuga y por lo tanto se llena con agua destilada.

Una vez verificado que el sistema no presentaba fuga, se preparó gel separador al 12% y se colocó en el sistema tratando de alcanzar un volumen de aproximadamente 2/3 del sistema. Se cubrió la parte restante del volumen con alcohol al 96% de concentración y se esperó aproximadamente 20 minutos hasta que se efectuó la polimerización.

Luego de la polimerización de la solución de separación se retiró el exceso de alcohol y se colocó gel concentrador al 4% para cubrir el sistema totalmente, se colocó un peine para formar pocillos e inmediatamente se selló el sistema con agarosa líquida para evitar la entrada de aire.

### 2.2.3.1 Preparación de muestra de proteína de las diferentes variedades de fréjol común (*Phaseolus vulgaris*) y electroforesis.

Las muestras de proteínas se prepararon a partir de una solución de 30ug de cada con la finalidad de llegar a una concentración de 15ug/ul.

Para llegar a esta concentración fue necesario alcanzar un volumen de 10 ul para cada variedad, esto en base a los valores de concentración obtenidos en la curva de calibración; la cantidad de agua destilada y cantidad de proteína a mezclar en microtubos de 200 ul se establece en la tabla 2.4.

Variedad	Cantidad de proteína(ul)	Cantidad de agua destilada(ul)
INIAP 482	2.73	7.27
INIAP 474	3.57	6.43
INIAP 473	4.15	5.85
TM-277	3.67	6.33
SUG-8	3.024	6.97
REM-5	2.17	7.83
FOT-61	2.28	7.62
ICTAJU	3.88	6.12
DURO BLANCO	1.77	-----

**Tabla 2-4: Cantidad de muestra de proteínas y agua destilada por cada variedad de fréjol común (*phaseolus vulgaris*) para obtener una concentración de 15ug/ul.**

Una vez obtenidas las diluciones se tomaron 4ul de cada una y se adiciono 4ul de buffer de muestra en otro microtubo de 200ul por muestra, se incubaron a baño maría durante 5 minutos a 90 grados en una estufa.

Posterior a esto se colocó el gel en la cubeta de electroforesis y se llenó con buffer de corrida(1x), se retiró el peine del gel y se añadió por triplicado 2ul de proteína diluida en cada pocillo, siendo el primer pocillo ocupado con 15ul de marcador molecular, se tapó la cubeta y se programó el equipo de electroforesis a 100V constantes durante 2 horas.

Una vez terminada la electroforesis el gel fue retirado de los vidrios con ayuda de una piseta con agua y un cortador, se colocó en placas de Petri y se añadió azul de coomassie hasta que cubrió el gel durante media hora sobre un agitador, posterior a esto se hicieron lavados con ácido acético para quitar el exceso de azul de coomassie.

#### **2.1.4 Electroforesis de segunda dimensión (2D-PAGE e Isoelectroenfoque)**

Este proceso tiene como finalidad separar a las proteínas en base a su punto isoeléctrico y se da en cuatro etapas que incluyen: la rehidratación de tiras de acetato con la muestra de proteínas, el proceso de Isoelectroenfoque (IEF), equilibrado de las tiras post-Isoelectroenfoque y la técnica 2D-PAGE.

##### **2.1.4.1 Rehidratación de tiras**

Para la rehidratación de tiras, se utilizaron tiras de acetato con un gradiente de concentración de pH de 3-10 y 7cm de longitud, a las cuales se adicionó proteína de casa variedad de fréjol junto con buffer de rehidratación Ready Prep (2-D Starter Kit Rehydration/sample buffer-BIORAD). la cantidad de proteína y de buffer varía según la concentración determinada en el proceso de curva de calibración de proteínas para un volumen final de 125 ul según el protocolo. La mezcla de extracto de cada variedad de proteínas se colocó junto con el buffer de rehidratación en una bandeja de canales, posteriormente se colocó la tira boca abajo junto con aproximadamente 2000 ul de aceite mineral para evitar la evaporación, luego se dejó reposar en un tiempo aproximado de 16 horas a temperatura ambiente.

##### **2.1.4.2 Isoelectroenfoque (IEF)**

La técnica de Isoelectroenfoque se basa en la separación de proteínas respecto al punto isoeléctrico, el cual es la medida de pH a la cual una proteína presenta carga neutra, esto va a permitir que cada conjunto de proteínas se fije en un rango horizontal determinado luego de ejecutar la técnica.

Una vez que las tiras fueron hidratadas se montaron con ayuda de pinzas en un soporte con carriles pertenecientes al equipo Protean i12 IEF Cell-BIORAD desde la bandeja de canales, tomando en cuenta que la orientación de la tira es positiva a negativa y con el gel boca abajo, en cada extremo de la tira se agregó una pieza de papel filtro a los cuales

se adiciona 8ul de agua nano pura para reducir la cantidad de sales que puedan interferir en el proceso de flujo de corriente por parte del buffer de rehidratación al sistema, adicional a esto se agregó aproximadamente 2000 ul de aceite mineral nuevamente. Con ayuda del equipo se fija el protocolo correspondiente según las características de la tira el cual va a proporcionar un voltaje máximo de 15000 V al final del proceso en un tiempo aproximado de entre 5 a 7 horas según la longitud de la tira.

#### **2.1.4.3 Equilibrio de tiras**

El equilibrio de tiras es un proceso post-Isoelectroenfoque en el cual se procede a retirar el exceso de aceite por medio de dos buffer de equilibrio Buffer Ready Prep(2-D Starter Kid Equilibration Buffer I y II), las tiras se colocaron en una bandeja de canales previo al retirado del exceso de aceite y se adicionaron aproximadamente 2000 ul de Buffer I y II en la que se dejó reposar la tira junto con cada buffer durante aproximadamente 15 min respectivamente.

#### **2.1.4.4 2-D PAGE**

La técnica de 2-D PAGE o segunda dimensión permite separar a las proteínas por su peso molecular previo a una separación en base a su punto isoeléctrico.

Para ejecutar esta técnica se debe elaborar geles de poliacrilamida en función de gel separador al 12% para posteriormente efectuar la disociación de las proteínas de forma vertical al aplicar un voltaje contrastante de 100 V, de esta forma se obtiene un gel bidimensional para el análisis de proteínas en base a los dos componentes ya mencionados.

Para empezar, se limpiaron con alcohol y agua los dos vidrios de diferente grosor que conforman el sistema de polimerización del gel, para la elaboración del gel se sigue la composición establecida en la tabla 2.3., el gel se añadió inmediatamente entre los vidrios con ayuda de una pipeta de 1000 ul sin llegar al tope, se agregó una capa de etanol para terminar de sellar el sistema y se esperó alrededor de 20 minutos hasta que se efectúa la polimerización.

Una vez que el gel se polimerizó, se vertió buffer de corrida(1x) en una probeta de 500 ml y se hizo un lavado de la tira con ayuda de una pinza sumergiéndola en el buffer de

corrida(1x), hecho esto la tira se colocó de forma horizontal sobre el gel dejando un espacio para el marcador de peso molecular. Se puso un pedazo de papel filtro en el espacio establecido para el marcador molecular y con ayuda de una micropipeta de 10ul se colocaron 5ul de marcador de peso molecular BenchMark Protein Ladder sobre el papel filtro, una vez colocada la tira se añadió agarosa para sellar el sistema y con una lanceta se retiró la cantidad de burbujas que puedan formarse entre la tira y el sistema. Se colocó el gel en una cubeta de electroforesis y se llenó con buffer de corrida(1x), se procedió a tapar la cubeta y conectarla a la fuente de poder estableciendo un voltaje de 100V o de un amperaje de 35A de forma constante en un tiempo de 2 horas. El proceso de teñido y desteñido de los geles es igual al de la técnica SDS-PAGE en geles de 1D.

### **2.1.5 Análisis de proteínas**

La visualización de los patrones electroforéticos para el análisis de proteínas posterior a la tinción se efectuó por medio de fotografías de los geles con ayuda del equipo Perkin Elmer modelo ProXCISION, el análisis de geles de una dimensión se ejecutó por medio del programa Image lab 6.0. en el cual se establecen una determinada de cantidad de bandas verticales para cada patrón de proteínas en base al marcador de peso molecular empleado para posteriormente determinar la naturaleza de cada conjunto de proteínas.

### **2.1.6 Análisis estadístico**

el análisis estadístico de los datos obtenidos de peso molecular y absorbancia se efectuó por medio del programa MetaboAnalyst y fueron sometidos a las pruebas de: análisis de varianza (ANOVA), análisis de componentes principales (ACP) e índice de correlación de Pearson para encontrar las diferencias y semejanzas entre las diferentes variedades.

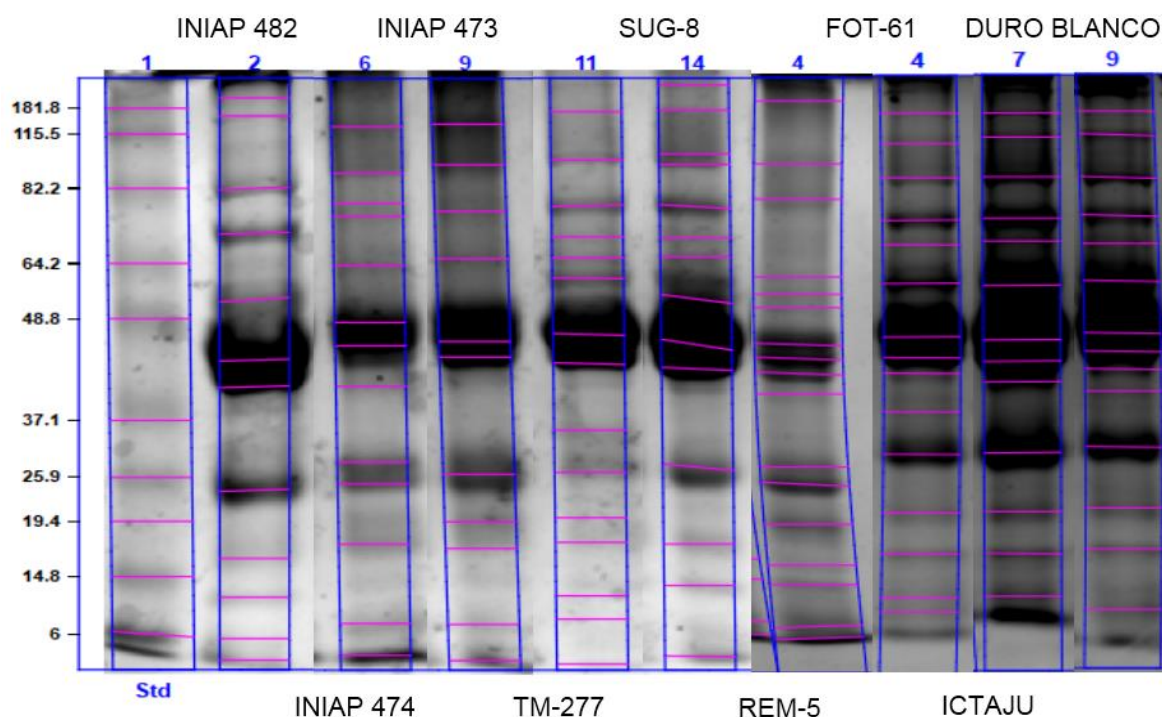


# CAPÍTULO 3

## 3 RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 3.1 Análisis de geles 1D PAGE

Para poder analizar las diferentes proteínas que se expresan ante el estrés hídrico en las 9 variedades de fréjol común (*Phaseolus vulgaris*) se procedió a examinar los diferentes patrones de concentración de proteínas en geles 1D PAGE, los diferentes genotipos o variedades muestran patrones similares en todas las bandas sin embargo existen rangos que fluctúan entre las variedades debido a la concentración de proteína presente y diferencia genética, para poder ejecutar un identificación de grupos de proteínas más idónea se recurrió a la técnica 2D PAGE donde se ejecutó una electroforesis adicional en base al pH con un rango entre 3 y 10. La figura tres muestra las bandas en gel unidimensional de las diferentes proteínas y su concentración en base al peso molecular expresado en kilo Dalton (kDa) de todas las variedades analizadas.



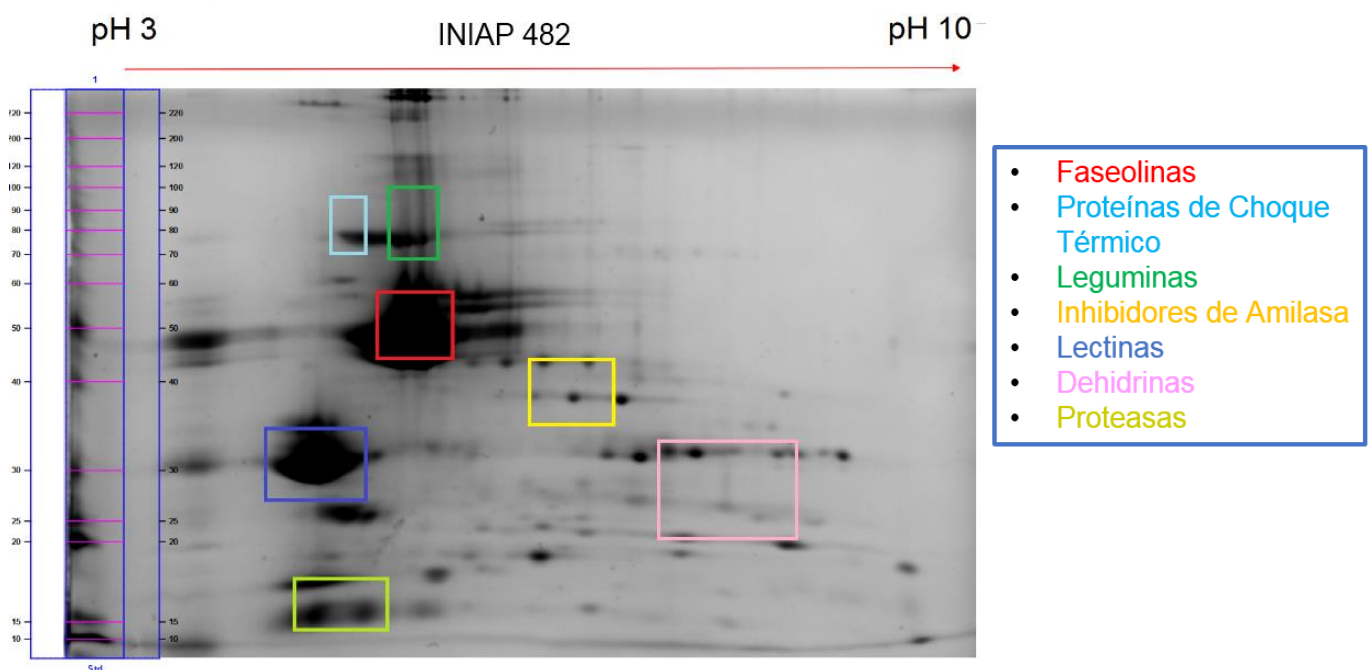
**Figura 3:** patrones de banda para todas las variedades en gel 1D PAGE cada banda representa un gradiente de concentración de proteínas en base al peso molecular medido en kD.

### 3.2 Análisis de geles 2D PAGE

Para poder establecer una clasificación más exhaustiva de los patrones de variación de proteína y proteínas que se expresan antes el estrés hídrico, se procedió a realizar la técnica 2-D page, cuyos resultados permitieron clasificar a los patrones de expresión de proteínas por su pH además de su peso molecular.

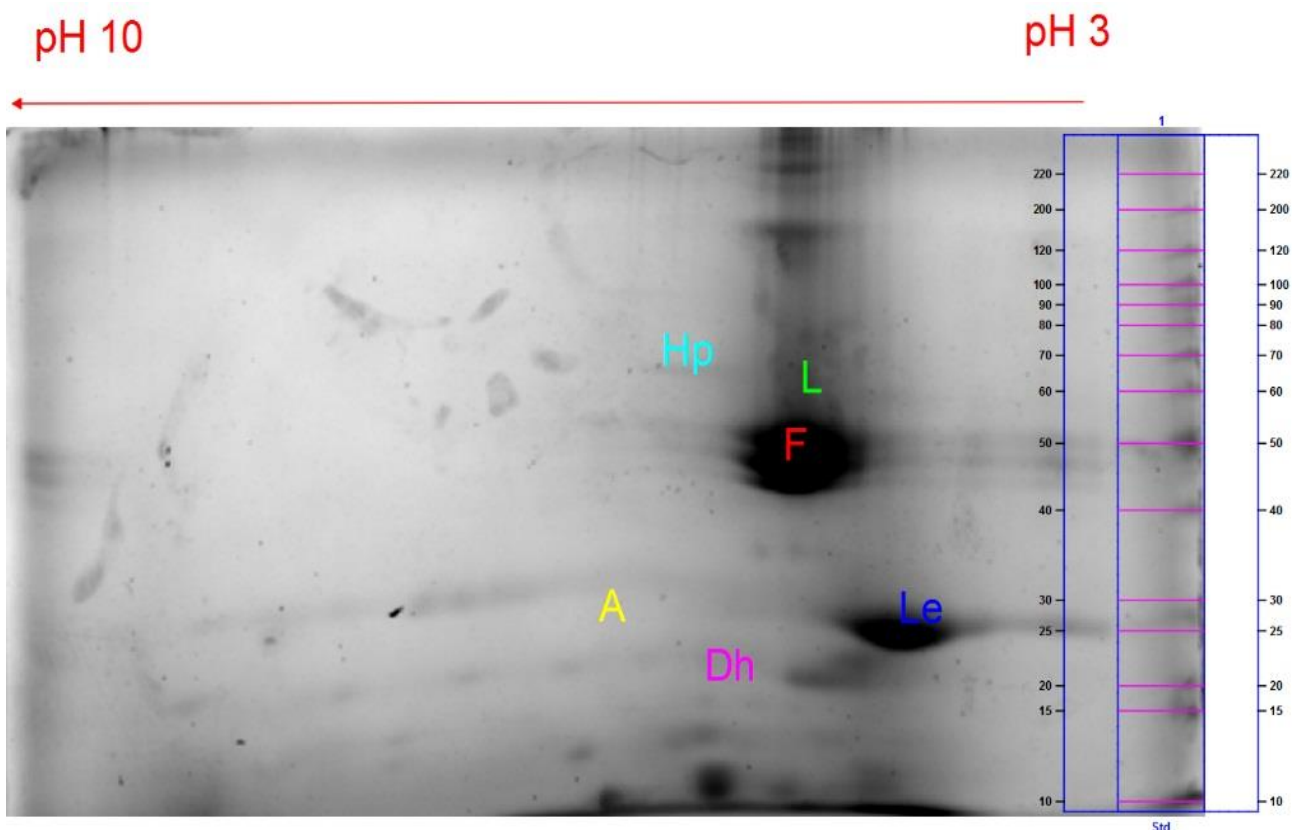
Todos los geles evaluados presentaron una alta densidad de tinción en un rango de entre 40 a 55 kDa y a un pH ácido de entre 5.20 y 5.50 , siendo estos valores similares a los del grupo de las Faseolinas, los demás spots reflejaron una densidad de tinción menor entre variedades encontrándose proteínas de distintos grupos que incluyeron: Leguminas con un valor aproximado de pH de 5.69 y peso molecular de 69kDa ,proteínas de choque térmico(HPSs) con un valor aproximado de pH de 5.28 y peso molecular de 71kDa,dehidrinas con un valor aproximado de pH de 5.97 y peso molecular de 26 kDa, Lectinas e inhibidores de amilasa con un rango de pH de 4.83 a 5.80 y peso molecular en un rango de 29 a 32 kDa y defensinas o inhibidores de proteasas con un rango de peso molecular entre 8 a 16 kDa.

La figura 3 muestra el gel 2D PAGE para la variedad INIAP 482, en el mismo se observaron los diferentes grupos de proteínas presentes en base al peso molecular y su pH, encontrándose todos los grupos de proteínas descritos y su aproximada ubicación a lo largo del gel.



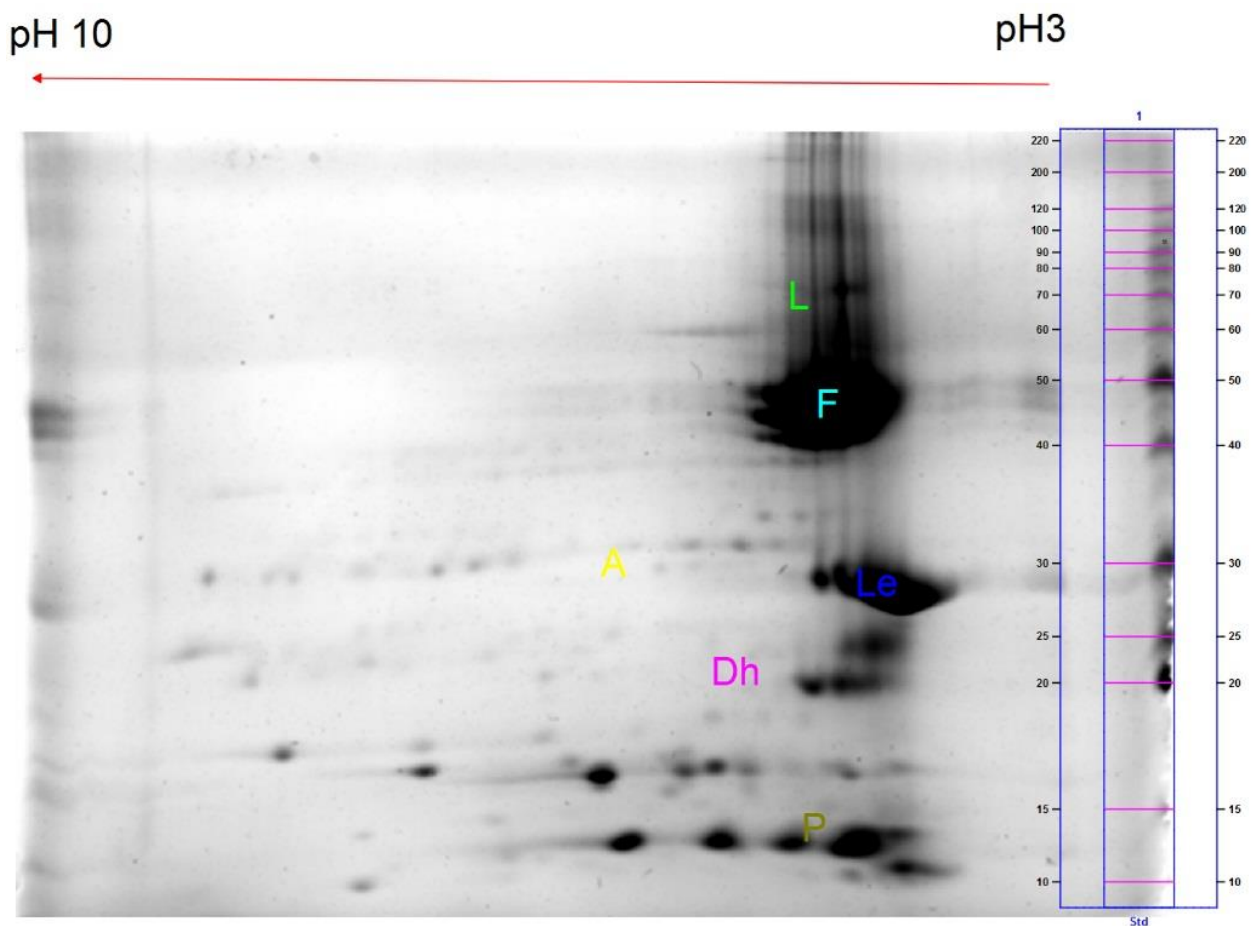
**Figura 4:** gel 2D PAGE para la variedad INIAP 482, proteínas de choque térmico (Hp), Leguminas(L), Faseolina (F), Lectinas (Le), Inhibidores de amilasa(A), Dehidrinas (Dh), Inhibidores de proteasa (P).

La figura 5 muestra los diferentes spots a lo largo del gel 2D PAGE para la variedad INIAP 474, en el mismo se encontró una alta densidad de tinción para los patrones de Faseolinas(F) y lectinas(Le) se evidencia poca densidad de tinción para las dehidrinas(Dh) y proteínas de choque térmico (Hp) ,así también como para las leguminas(L) e inhibidores de amilasa(A) tampoco se encontró evidencia representativa sobre la expresión de inhibidores de proteasa(P).



**Figura 5:** gel 2D PAGE para la variedad INIAP 474.

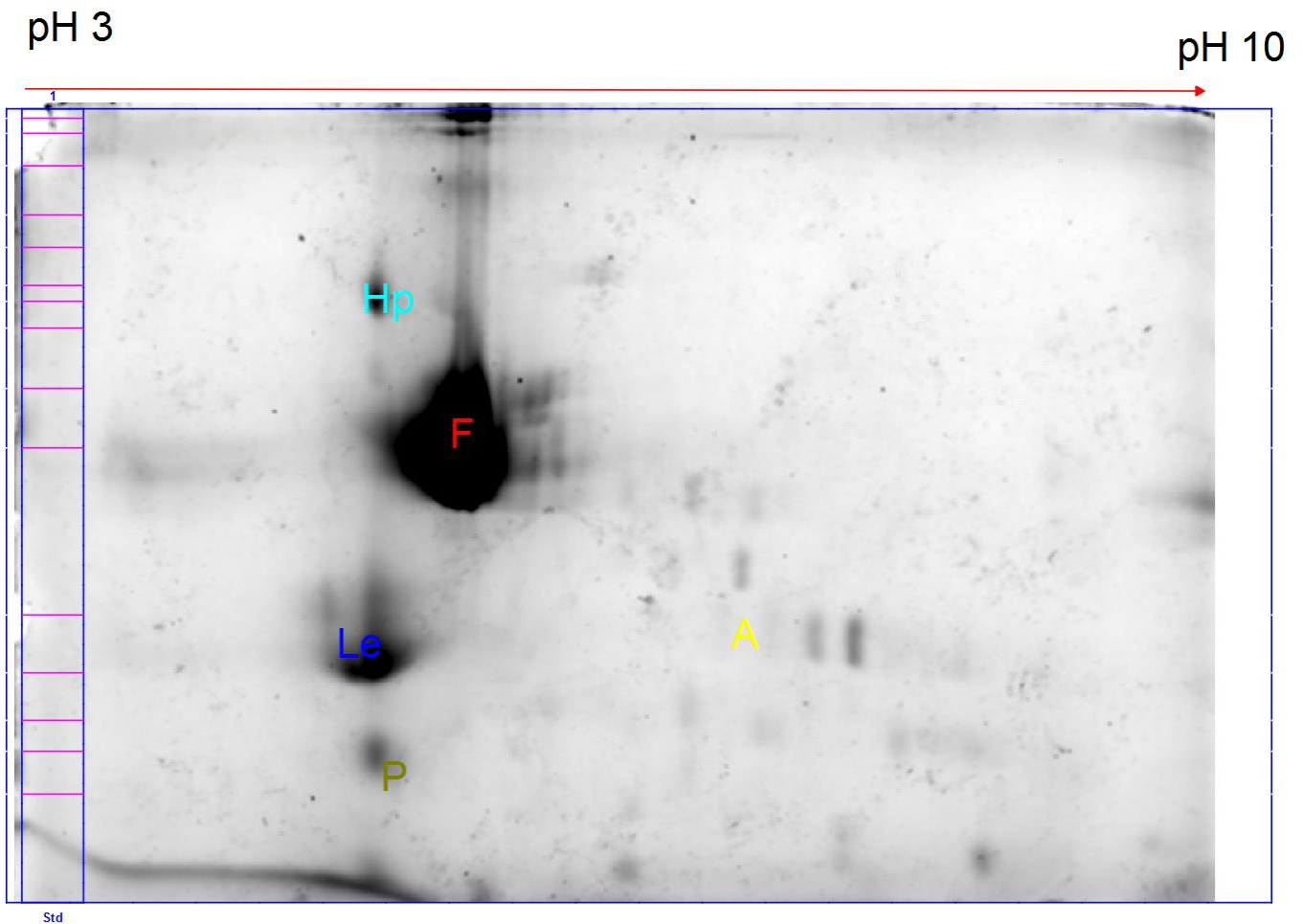
La figura 6 muestra los diferentes spots a lo largo del gel 2D PAGE para la variedad INIAP 473, en él se pudo evidenciar altos patrones de densidad de tinción para los perfiles de Faseolinas (F), lectinas (Le) e inhibidores de proteasa (P); siendo las dehidrinas (Dh) poco perceptibles en su expresión y contando con la ausencia de un patrón marcado para las proteínas de choque térmico (Hp).



**Figura 6:** gel 2D PAGE para la variedad INIAP 473.

La figura 7 muestra los diferentes spots a lo largo del gel 2D PAGE para la variedad TM-277, el cual mostró altos patrones de densidad de tinción para Faseolinas (F) y lectinas (Le), estos patrones de tinción son menores en relación a las proteínas de choque térmico (Hp), inhibidores de proteasa (P) e inhibidores de amilasa (A); no se muestra la

presencia de dehidrinas (Dh) ni Faseolinas (F) o en su defecto se presumió de una baja expresión o nula.

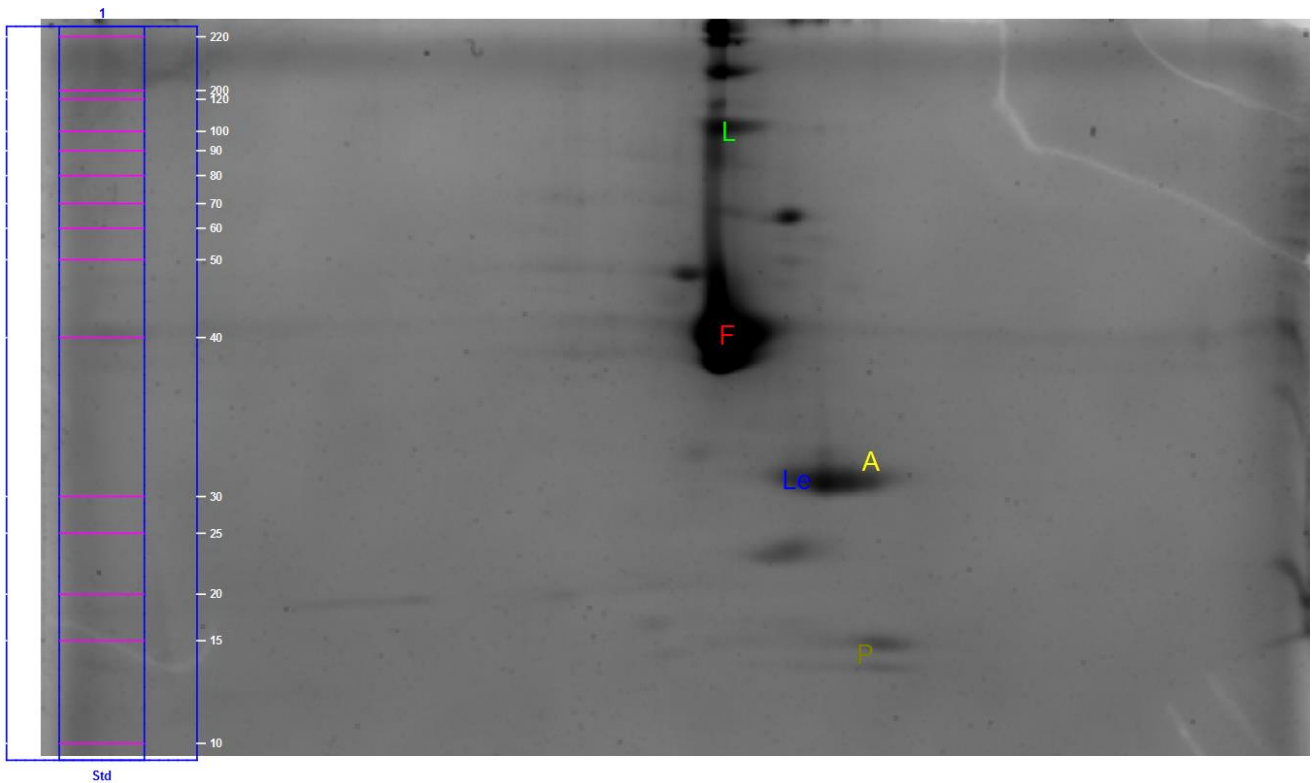


**Figura 7:** gel 2D PAGE para la variedad TM-277.

La figura 8 muestra los diferentes spots a lo largo del gel 2D PAGE para la variedad SUG-8 en donde los perfiles de faseolina (F), Legumina (L), lectinas (Le) e inhibidores de amilasa (A) se encontraron de forma sobresaliente respecto a los inhibidores de proteasa (P); además no se evidencia perfiles de dehidrinas (Dh).

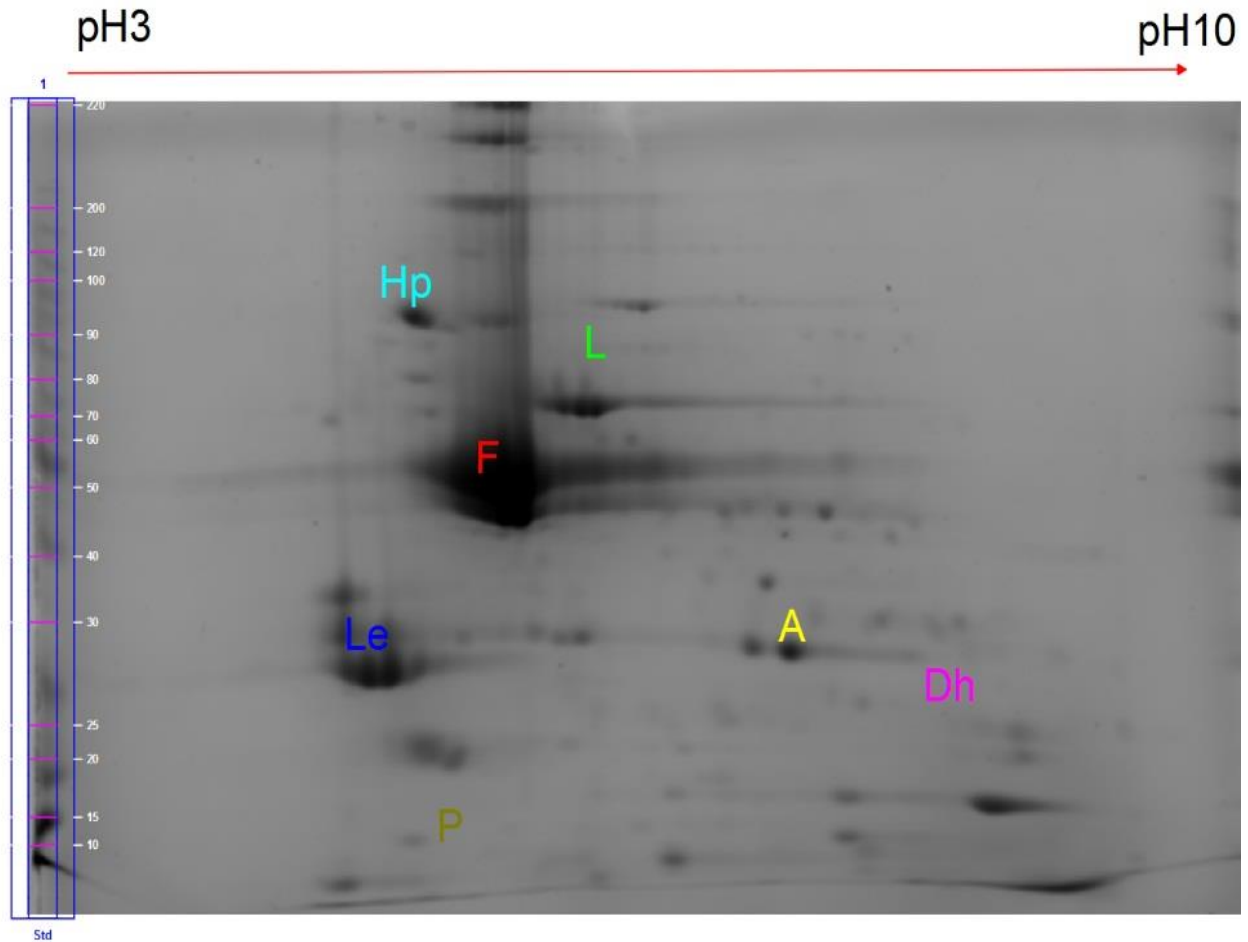
pH 3

pH 10



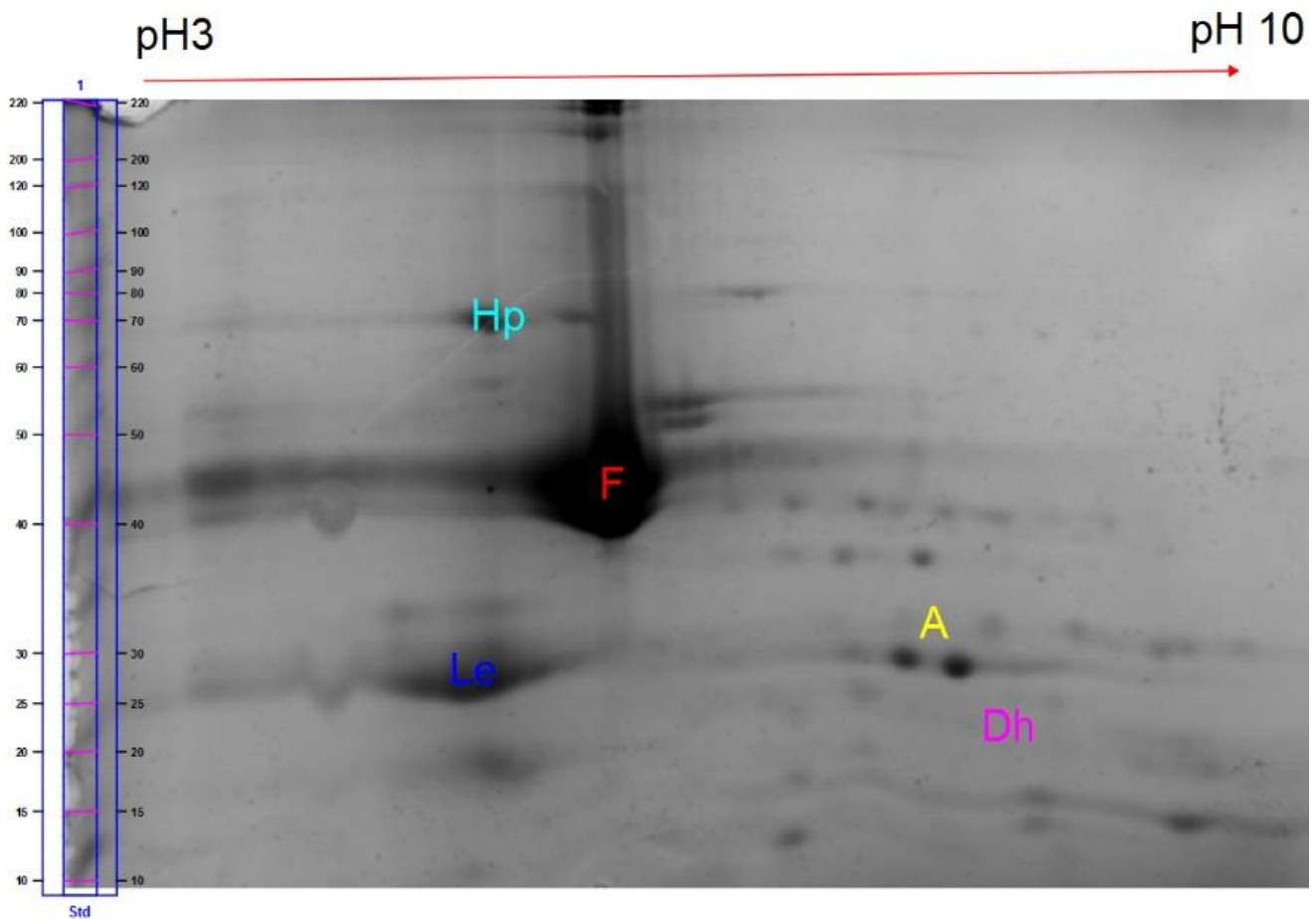
**Figura 8:** gel 2D PAGE para la variedad SUG-8.

La figura 9 muestra los diferentes spots a lo largo del gel 2D PAGE para la variedad REM-5 en donde se encontraron altos patrones de densidad de tinción para las Faseolinas (F) y lectinas (Le), se notó una baja presencia de patrones de tinción para perfiles de dehidrinas (Dh) e inhibidores de proteasa (P) y de amilasa (A) pero a su vez una densidad de tinción considerable para los perfiles considerados en las proteínas de choque térmico (Hp) a su vez los perfiles para la legumina (L) se ven escasamente expresados.



**Figura 9:** gel 2D PAGE para la variedad REM-5.

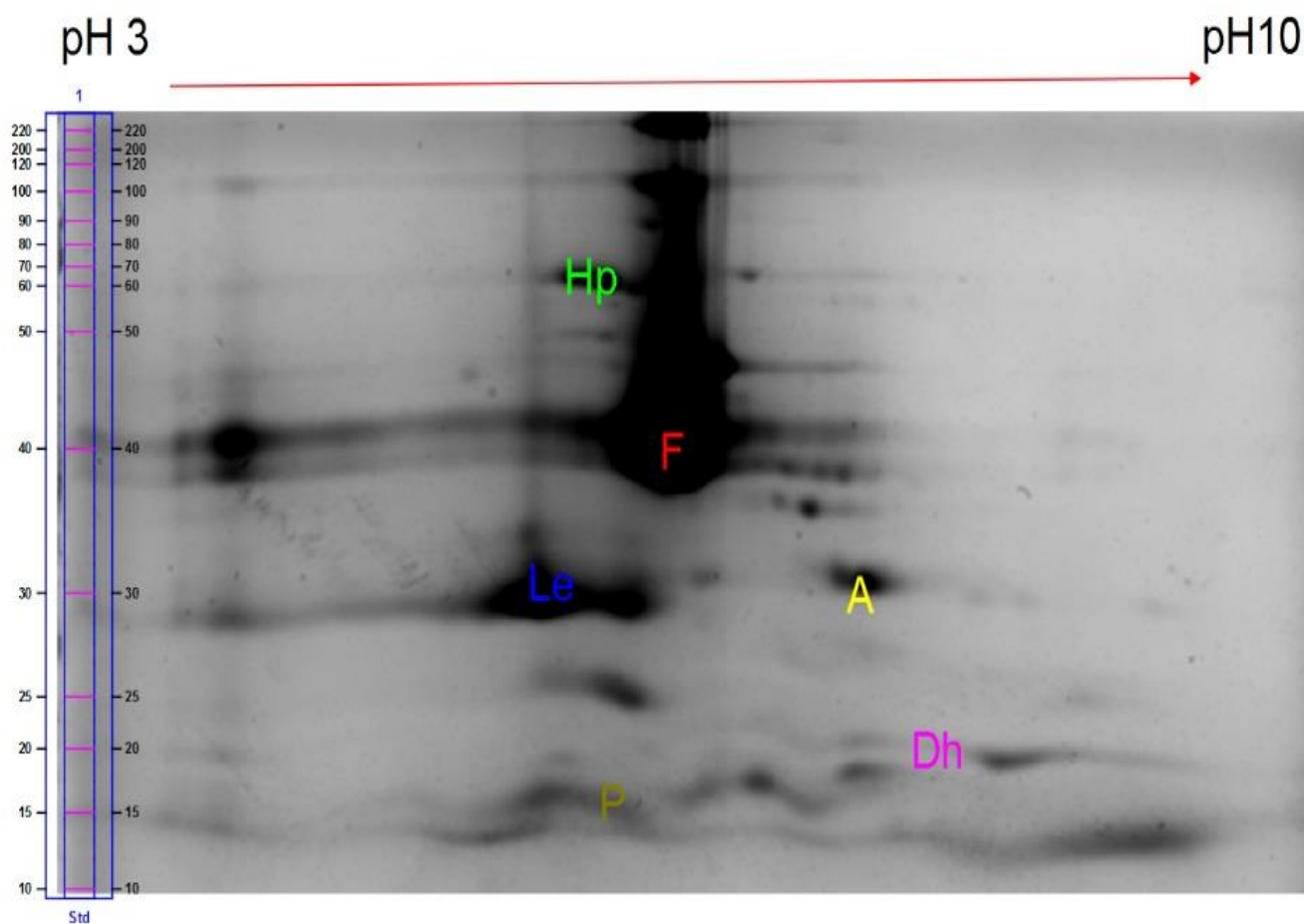
La figura 10 muestra los diferentes spots a lo largo del gel 2D PAGE para la variedad FOT-61, en donde los perfiles de faseolina (F) presentaron la mayor densidad de tinción, los perfiles de inhibidores de amilasa (A), lectinas (Le) y proteínas de choque térmico (Hp) presentan perfiles considerables de tinción; se presenció bajos perfiles de dehidrinas (Dh) y la ausencia de leguminas (L) e inhibidores de proteasa (P) reflejados como resultado de una baja o nula expresión.



**Figura 10:** gel 2D PAGE para la variedad FOT-61

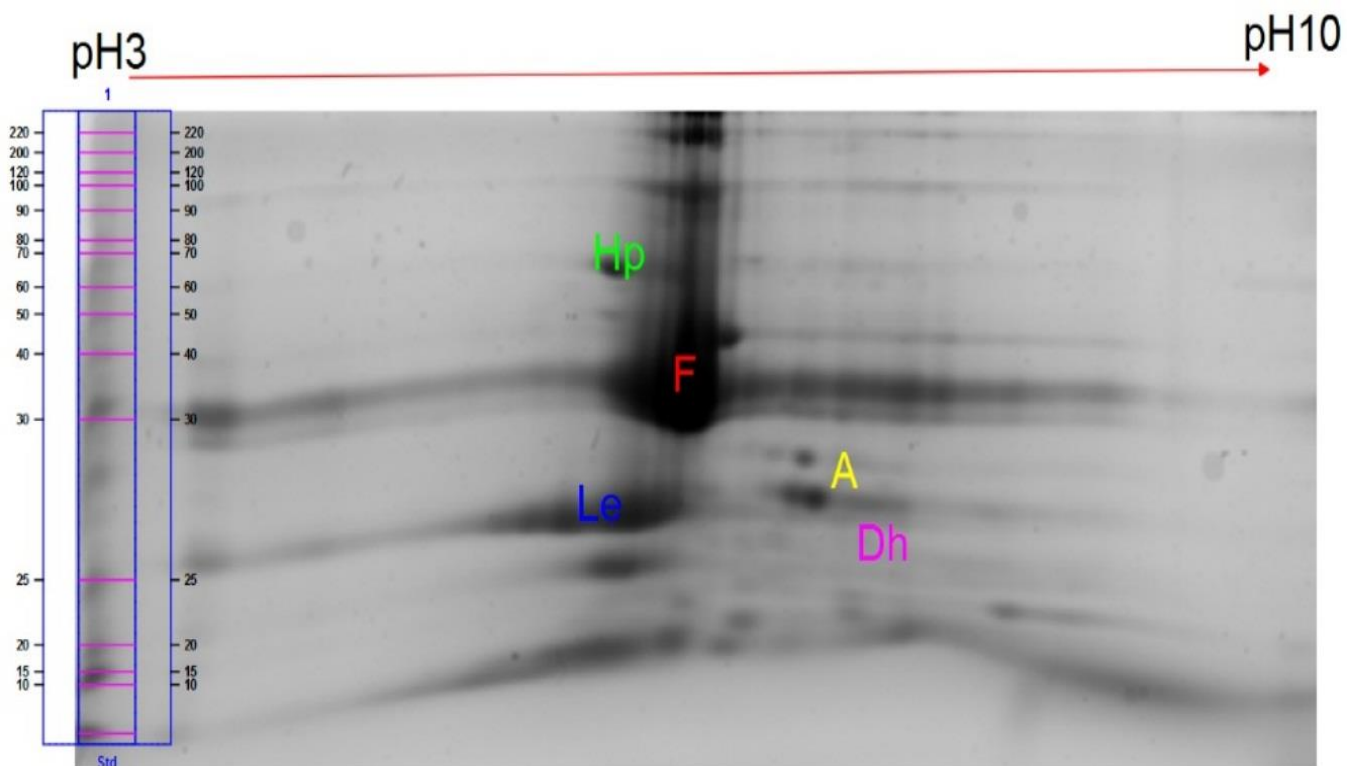
La figura 11 muestra los diferentes spots a lo largo del gel 2D PAGE para la variedad ICTAJU, cuya densidad de tinción para el rango de la Faseolinas (F),proteínas de choque térmico (Hp),lectinas (Le) e inhibidores de amilasa (A) estuvo fuertemente marcada, la densidad de tinción para los patrones de dehidrinas (Dh) e inhibidores de proteasa fue menor en relación a estas, no fue posible evidenciar un perfil para leguminas (L).





**Figura 11:** gel 2D PAGE para la variedad ICTAJU.

La figura 12 muestra los diferentes spots a lo largo del gel 2D PAGE para la variedad DURO BLANCO, en el cual se encontró perfiles para faseolina (F), lectinas (Le) y proteínas de coque térmico (Hp) con una alta densidad de tinción, por otra parte para los inhibidores de amilasa (A) y dehidrinas (Dh), la expresión en relación a la densidad de tinción fue considerable; no se encontró perfiles de densidad de tinción para los inhibidores de proteasa (P) y leguminas (L).



**Figura 12:** gel 2D PAGE para la variedad DURO BLANCO.

### 3.3 Análisis de varianza (ANOVA)

Para encontrar las diferencias significativas entre cada una de las variedades respecto a su composición en peso molecular de cada banda expresada en geles unidimensionales se procedió a realizar la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA-one way), cada valor de peso molecular fue normalizado y analizado en base a un ajuste de valores estándar que fue proporcionado por el software Image lab 6.0. para luego ser ingresados en la plataforma MetaboAnalyst.

El análisis de varianza ejecutado demostró que existe diferencia significativa entre grupos respecto a los valores de peso molecular en kDa entre todas las variedades para un valor p de confianza de 0.05, el análisis post-hoc en la prueba de Tuckey's demostró que la variedad DURO BLANCO es la que mayor diferencias significativas presenta con todas las demás, se reportó diferencias significativas entre la variedad SUG-8 y las variedades FOT-61,ICTAJU e INIAP 473,la variedad INIAP 474 presento diferencias significativas con las variedades FOT-61,ICTAJU e INIAP 482,estas últimas variedades

presentan diferencias significativas con la variedad INIAP 473, por último la variedad TM-277 presenta diferencias significativas altas para todas las variedades al igual que DURO BLANCO. La figura 13 muestra los valores obtenidos en las pruebas post-hoc para el ANOVA de una vía en las nueve variedades de fréjol común (*Phaseolus vulgaris*).

Table 2: Important features identified by One-way ANOVA and post-hoc analysis

Compounds	f.value	p.value	-log10(p)	FDR	Tukey's HSD	
1	37.77	4074.20	0.00	26.98	0.00	FOT_61-DURO BLANCO; REM_5-DURO BLANCO; ICTAJU-FOT_61; INIAP_473-
2	33.38	1332.40	0.00	22.62	0.00	INIAP_473-DURO BLANCO; INIAP_474-DURO BLANCO; INIAP_482-DURO BLA
3	134.78	1183.30	0.00	22.16	0.00	INIAP_473-DURO BLANCO; INIAP_473-FOT_61; INIAP_473-ICTAJU; INIAP_474-
4	86.25	743.60	0.00	20.34	0.00	ICTAJU-DURO BLANCO; INIAP_473-DURO BLANCO; INIAP_474-DURO BLANC
5	53.11	711.33	0.00	20.17	0.00	INIAP_473-DURO BLANCO; INIAP_474-DURO BLANCO; INIAP_482-DURO BLA
6	60.24	639.93	0.00	19.76	0.00	REM_5-DURO BLANCO; TM_277-DURO BLANCO; REM_5-FOT_61; TM_277-FOI
7	13.60	594.34	0.00	19.47	0.00	INIAP_473-DURO BLANCO; INIAP_474-DURO BLANCO; REM_5-DURO BLANCO
8	40.31	489.50	0.00	18.72	0.00	FOT_61-DURO BLANCO; ICTAJU-DURO BLANCO; INIAP_474-DURO BLANCO
9	110.46	354.64	0.00	17.47	0.00	FOT_61-DURO BLANCO; ICTAJU-DURO BLANCO; REM_5-DURO BLANCO; IC
10	25.34	321.80	0.00	17.09	0.00	INIAP_473-DURO BLANCO; INIAP_474-DURO BLANCO; INIAP_482-DURO BLA
11	28.37	240.88	0.00	15.97	0.00	INIAP_473-DURO BLANCO; REM_5-DURO BLANCO; SUG_8-DURO BLANCO; T
12	73.37	223.62	0.00	15.68	0.00	INIAP_473-DURO BLANCO; INIAP_482-DURO BLANCO; REM_5-DURO BLANCO
13	153.37	161.07	0.00	14.42	0.00	ICTAJU-DURO BLANCO; INIAP_473-DURO BLANCO; INIAP_474-DURO BLANC
14	143.15	103.95	0.00	12.75	0.00	INIAP_474-DURO BLANCO; REM_5-DURO BLANCO; INIAP_474-FOT_61; REM_5
15	7.12	85.68	0.00	12.02	0.00	INIAP_473-DURO BLANCO; INIAP_474-DURO BLANCO; INIAP_482-DURO BLA
16	101.09	82.73	0.00	11.88	0.00	SUG_8-DURO BLANCO; SUG_8-FOT_61; SUG_8-ICTAJU; SUG_8-INIAP_473; SUG
17	95.81	79.56	0.00	11.74	0.00	INIAP_473-DURO BLANCO; INIAP_474-DURO BLANCO; TM_277-DURO BLANC
18	108.55	73.21	0.00	11.42	0.00	FOT_61-DURO BLANCO; ICTAJU-DURO BLANCO; INIAP_473-DURO BLANCO
19	47.63	36.12	0.00	8.81	0.00	INIAP_474-DURO BLANCO; INIAP_482-DURO BLANCO; REM_5-DURO BLANCO
20	19.66	35.10	0.00	8.71	0.00	INIAP_474-DURO BLANCO; SUG_8-DURO BLANCO; TM_277-DURO BLANCO; I
21	77.61	29.79	0.00	8.12	0.00	INIAP_482-DURO BLANCO; TM_277-DURO BLANCO; INIAP_482-FOT_61; TM_2'
22	63.54	27.46	0.00	7.84	0.00	INIAP_482-DURO BLANCO; REM_5-DURO BLANCO; TM_277-DURO BLANCO;
23	6	23.91	0.00	7.35	0.00	INIAP_473-DURO BLANCO; INIAP_474-DURO BLANCO; INIAP_482-DURO BLA
24	70.66	22.60	0.00	7.16	0.00	REM_5-DURO BLANCO; SUG_8-DURO BLANCO; TM_277-DURO BLANCO; REM
25	170.38	19.91	0.00	6.72	0.00	SUG_8-DURO BLANCO; TM_277-DURO BLANCO; SUG_8-FOT_61; TM_277-FOT_
26	181.8	19.55	0.00	6.66	0.00	INIAP_473-DURO BLANCO; INIAP_474-DURO BLANCO; TM_277-DURO BLANC
27	44.42	15.94	0.00	5.98	0.00	INIAP_473-DURO BLANCO; INIAP_474-DURO BLANCO; SUG_8-DURO BLANCC
28	18.97	7.35	0.00	3.64	0.00	INIAP_474-FOT_61; INIAP_474-ICTAJU; INIAP_474-INIAP_473; INIAP_482-INIAP_

**Figura 13:** Análisis Post-Hoc en ANOVA de una vía, resalta el valor p menor al intervalo estadístico de confianza 0.05, la prueba de Tukey's HSD muestra las variedades de fréjol común (*Phaseolus vulgaris*) que presentan más diferencias significativas entre grupos.

### 3.4 Análisis de correlación

Por medio del análisis de correlación se pudo establecer que tan semejantes fueron las muestras por triplicado de cada una de las variedades evaluadas, los valores del índice de correlación los cuales fluctúan entre 1,0 y -1 nos permiten estimar este tipo de relaciones de forma cualitativa entre las variables, la figura 14 muestra los diferentes patrones de correlación existentes entre las 9 variedades de fréjol común (*Phaseolus vulgaris*) por medio de una escala de colores establecida en base a un mapa de puntos de calor(heatmap).

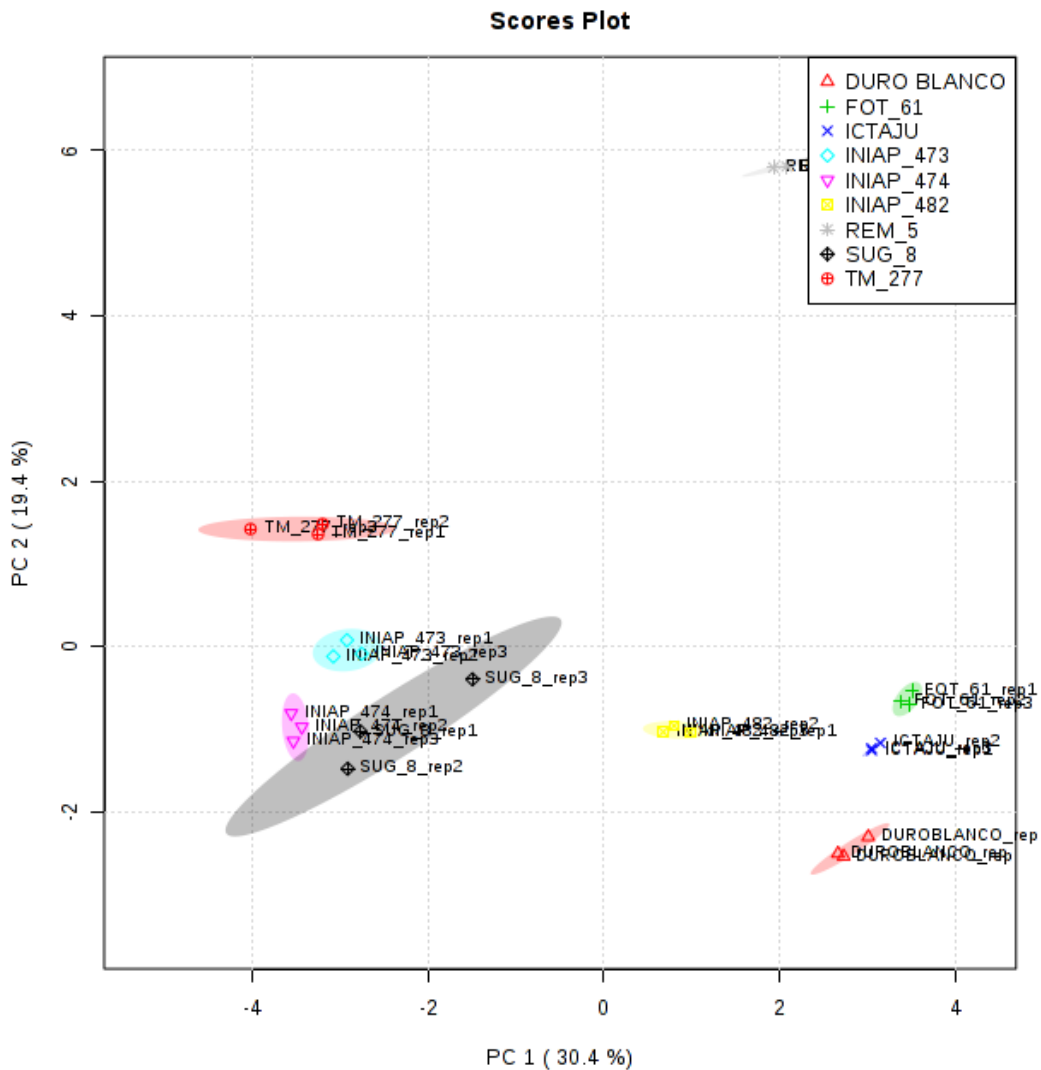


a las otras y por lo tanto la covarianza reflejada se da en patrones inversos estando por lo tanto más correlacionadas entre sí.

### **3.5 Análisis de componentes principales (ACP)**

Se hizo uso de este método para agrupar las variedades de *Phaseolus vulgaris*, que se encuentran mayormente asociados, obteniendo así un conjunto de datos que nos arroja valores positivos y negativos, debido a que este método se rige por vectores, es decir toma en cuenta magnitud y dirección para establecer un gráfico. Con las 9 variedades y cada una de sus tres replicas, se mostró que la mayor parte de la variabilidad fue explicada por los dos primeros componentes de la matriz, "CP1" que agrupa un 30,4% de variación para proteínas de diferentes pesos moleculares, en dirección negativa se encuentra mayormente asociada con las variedades INIAP 474, TM 277, SUG-8 e INIAP 473 y en relación positiva FOT- 61, ICTAJU, DURO BLANCO e INIAP 482; El "CP2" agrupa un 19,4% de variación total estableciendo en las coordenadas positivas TM 277 e INIAP 473 también se encuentra REM 5, sin embargo dada la gran distancia que tiene con respecto al eje de las abscisas se lo podría tomar como la menos asociada con las otras variedades, en cuanto a las variables negativas se encuentran las variedades INIAP 473 y SUG-8; obteniendo como resultado la gráfica 2D en diferentes direcciones, en el cual muestra que cada una de las réplicas para cada variedad están fuertemente asociadas a sí mismas, a excepción de la variedad SUG-8 en donde se tiene una mayor incertidumbre en el volumen ajustado para los pesos moleculares promedios.

En la Figura 15 se puede observar como las variedades ICTAJU, FOT-61 e INIAP 482 están asociados, ya que se lo puede observar en el mismo espacio positivo y la distancia entre ellos es considerable, esto se puede corroborar con la tabla de correlación, en donde establece valores de correlación de 0,9 para estas variedades, lo que nos da como resultado un proximidad entre estas variables con una alta correlación entre ellas, para la variedad SUG-8 se observa que está relacionada mayormente con las variedades INIAP 474 e INIAP 473, con valores de correlación de 0,7 – 0,4.



**Figura 15:** Grafica 2D de Análisis de Componentes Principales (ACP), se puede observar la distribución categórica de las distintas variedades de *Phaseolus vulgaris* y la correlación entre ellas.

La Figura 16 se observa en el eje de abscisas el CP1 y en el de la coordenada CP2, las flechas rojas representan cada uno de los promedios de pesos moleculares, la longitud de cada uno de ellos representa el valor del coeficiente de esa variable en ese componente.



# CAPITULO 4

## 4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A lo largo del desarrollo de este trabajo se evaluó 9 variedades pertenecientes a la especie *Phaseolus vulgaris* en relación a las diferencias en los patrones de expresión de proteínas junto con la identificación de los diferentes grupos de proteínas que se presentan ante condiciones de estrés hídrico por medio de técnicas de proteómica SDS-PAGE de una y dos dimensiones, El análisis de los resultados se ejecutó en base a las imágenes obtenidas de los geles unidimensionales y bidimensionales y fueron respaldados con ayuda de diagramas de barras y las pruebas estadísticas de: Análisis de varianza(ANOVA),Índice de correlación y Análisis de componentes principales(ACP).

En base a los resultados obtenidos es posible definir aproximadamente a las variedades con mayores diferencias en la expresión de proteínas y a su vez aquellas que se encuentran óptimas para desarrollarse en condiciones de estrés hídrico. El análisis de los geles en dos dimensiones evidenció la presencia de diferentes proteínas en base al peso molecular y escala de pH.

Todos los geles evaluados presentaron una alta densidad de tinción en un rango de entre 40 a 55 kDa y a un pH ácido de entre 5.20 y 5.50 , siendo estos valores similares a los del grupo de las Faseolinas, los demás spots reflejaron una densidad de tinción menor entre variedades encontrándose proteínas de distintos grupos que incluyeron: Leguminas con un valor aproximado de pH de 5.69 y peso molecular de 69kDa ,proteínas de choque térmico(HPSs) con un valor aproximado de pH de 5.28 y peso molecular de 71kDa,dehidrinas con un valor aproximado de pH de 5.97 y peso molecular de 26 kDa, Lectinas e inhibidores de amilasa con un rango de pH de 4.83 a 5.80 y peso molecular en un rango de 29 a 32 kDa y defensinas o inhibidores de proteasas con un rango de peso molecular entre 8 a 16 kDa.

Estos resultados expuestos anteriormente, dan paso a futuras investigaciones relacionadas con la proteómica aplicada para su estudio exhaustivo de proteínas involucradas en el estrés abiótico, y de las especies mejoradas que pueden ser



cultivadas en las Costas del Ecuador como un valor considerable en el aumento de la productividad de leguminosas que influyen positivamente en tierras de cultivo.

#### **4.1 Conclusiones**

En base a los análisis estadísticos ejecutados podemos establecer que la expresión génica de las diferentes proteínas pertenecientes a la variedad denominada DURO BLANCO son las que mayormente difieren respecto a las demás variedades, esto en base al análisis de varianza de una vía (ANOVA), siendo estas diferencias mucho más marcadas con las variedades ICTAJU y FOT-61 en relación con la covarianza reflejada según el mapa de puntos de calor o heatmap.

La expresión proteica de los diferentes spots en los geles 2S PAGE nos permite definir a las faseolina como una proteína constitutiva en las semillas de las nueve variedades de frejol común ya que estuvo presente en todas con la misma densidad de tinción.

La expresión proteica en porcentaje para las dehidrininas las cuales son proteínas más específicas a la respuesta ante estrés hídrico fueron mucho mayores en las variedades INIAP 482 (46,8%), FOT 61(26,4%), DURO BLANCO (3,6%) E ICTAJU (15,5%), calificándolas como las más óptimas ante estas condiciones abrasivas de cultivo para el crecimiento de la especie.

Por otra parte, la mayor cantidad de expresión en las proteínas denominadas inhibidores de proteasa fueron reportadas en las variedades INIAP 473 y REM-5 y los perfiles de expresión para las proteínas de choque térmico fueron altos para la variedad REM-5 y reducidos en relación con esta para las variedades INIAP 473 y SUG-8.

La presencia de proteínas estructurales de tipo legumina no se expresaron en mayor medida debido a que son proteínas de origen general relacionadas estrictamente con la familia de las leguminas, esto permite fundamentar la reducida presencia en esta especie.

En el análisis de componentes principales se establece como la de menor correlación con la demás variedades es REM 5, esto debido a que la elaboración del grafico de 2D

de los dos primeros componentes principales permitiría realizar la asociación para una mejor estimación de marcadores moleculares asociados a características fenotípicas, tal y como se utilizó en un estudio realizado por (Mayor Duran, 2016) en donde establece este análisis para la agrupación de los genotipos de esta especie comparando dos tipos de variedades con respecto al pedigrí de cada línea parental evaluada.

Estos resultados concuerdan con los estipulados por (ORTEGA, 2016), mayormente en donde establece la presencia de proteínas en las nueve variedades en su mayoría Faseolinas, así mismo en este estudio se determinó la presencia de proteínas de defensa, en todas las variedades, para el grafico de 2 D, sin embargo en comparación con los valores arrojados en los gráficos 1D establece que su presencia es poco considerable, en la variedad INIAP 482, esta información es corroborada por (ORTEGA, 2016) en su investigación en donde según su análisis exhaustivo en el proteoma del *Phaseolus vulgaris* existen proteínas defensinas en un rango de 5 a 7 kDa.

En cuanto a las dehidrinas proteínas mayormente asociadas con el estrés hídrico en nuestro estudio se identificó en un rango de 26 kDa. En el caso de (ORTEGA, 2016), mayormente identifico HSP10, proteínas asociadas así mismo al estrés hídrico, sin embargo con un cambio de rango de peso molecular, determinando así su presencia en un rango de 15 – 30 kDa, la autora establece que las variedades más aptas para tolerar un cambio en su medio por un factor abiótico, como el déficit de agua, fueron las siguientes: INIAP 473, INIAP 474, INIAP 482 y DURO BLANCO, estas 2 ultimas variedades también se vieron reflejados en nuestro estudio, reflejando como las más óptimas para el cultivo bajo condiciones de estrés hídrico.

## **4.2 Recomendaciones**

Es importante tener en cuenta la necesidad de ejecutar un estudio en condiciones de estrés hídrico para tener un análisis comparativo más amplio respecto a los resultados aquí establecidos en relación con la posible fluctuación de la expresión de proteínas de cada variedad.

Ejecutar un análisis por medio de la técnica de espectrometría de masas, ya que genera resultados más específicos al momento de identificar proteínas por sus diversos procesos de purificación e identificación de cadenas polipeptídicas.

## BIBLIOGRAFÍA

### 5 REFERENCIAS

- De Hoff, P., Brill, L., & Hirsch, A. (2009). Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Molecular genetics and genomics*, 1-15.
- Grant, O. (2012). Understanding and exploiting the impact of drought stress on plant physiology. *Abiotic Stress Responses in Plants. Springer*, 89-103.
- Loreti, E., Veen, H., & Perata, P. (2016). Plant responses to flooding stress. *Current Opinion in Plant Biology.*, 64-71.
- Messina, V. (2014). Nutritional and health benefits of dried beans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1-6.
- Scherm, H., & Coakley, S. (2003). Plant pathogens in a changing world. *Australasian Plant Pathology.*, 157-165.
- Schmutz, J., McClean, P., Mamidi, S., Wu, G., Cannon, S., Grimwood, J., . . . Torres-Torres, M. (2014). A reference genome for common bean and genome-wide. *NATURE GENETICS*, 707-713.
- Vaz Patta, M., Amarowicz, R., Aryee, A., Boye, J., Chung, H.-J., Martín-Cabrejas, M., & Domoney, C. (2015). Achievements and Challenges in Improving the Nutritional Quality of Food Legumes. *Critical reviews in plant sciences*, 105-143.

- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2014). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 1-14.
- Zargar, S. M., Mahajan, R., Nazir, M., Nagar, P., Kim, S. T., Rai, V., . . . Rakwal, R. (2017). Common bean proteomics: Present status and future strategies. *Journal of Proteomics*.
- Banco Central del Ecuador. (2018). *REPORTE DE COYONTURA SECTOR AGROPECUARIO*. Quito: Publicaciones Económicas.
- Johnová, P., Skalák, J., Saiz-Fernández, I., & Brzobohatý, B. (2016). Plants responses to ambient temperatures fluctuations and water-limiting condition a proteome-wide perspective. *Proteins and proteomic*.
- Kosová, K., Vítámvás, P., Prasil, I., & Renaut, J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress--contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of proteomics*, 1301-1322.
- Montoya, C., Lallès, J.-P., Beebe, S., & Leterme, P. (2010). Phaseolin diversity as a possible strategy to improve the nutritional value of. *Food Research International*, 443-449.
- Natarajan, S., Pastor-Corrales, M., Khan, F., & Garrett, W. (2013). Proteomic Analysis of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Journal of Basic & Applied Sciences.*, 424-437.
- Ortega, K. (2016). "IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO EN VARIEDADES COMERCIALES DEL FRÉJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris*) DE ECUADOR". Guayaquil, Guayas, Ecuador.

- Polón Pérez, R., Miranda Caballero, A., Ramírez Arrebato, M., & Maqueira López, L. (2014). Efectos del estrés de agua sobre el rendimiento de granos en la fase vegetativa en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias.*, 33-36.
- Sathe, S. (2008). Dry bean protein functionality. *Critical reviews in biotechnology*, 175-223.
- Singh, S. (2001). Broadening the genetic base of common bean cultivars: A review. *Crop Science*, 1659-1675.
- Smirnov, N. (1998). Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology*, 214-219.
- Ulloa , J., Ulloa, P., Ramírez , J., & Ulloa , B. (Septiembre de 2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Fuente*, 5-9. Obtenido de Research Gate.
- Wan, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Arie, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science*, 244-252.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science*, 244-252.
- Bacallao, M. F. (2014). Revisión bibliográfica TOLERANCIA A ESTRÉS POR DÉFICIT HÍDRICO EN TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.), 35(3), 20.
- Balkani, S., Shamekhi, S., Raoufinia, R., Parvan, R., & Abdolalizadeh, J. (2016). Purification and Characterization of Bovine Serum Albumin Using

- Chromatographic Method. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 6(4), 651-654.  
<https://doi.org/10.15171/apb.2016.080>
- Banco Central Del Ecuador. (2017, diciembre). Reporte de Coyuntura Sector Agropecuario. *Publicaciones Técnicas*, III(17), 38.
- Bitá, C. E., & Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00273>
- Bollini, R., & Vitale, A. (s. f.). Genetic variability in charge microheterogeneity and polypeptide composition of phaseolin, the major storage protein of *Phaseolus vulgaris*; and peptide maps of its three major subunits. *Physiologia Plantarum*, 52(1), 96-100. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1981.tb06040.x>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Briones, C., & Proaño, J. (2008). Gestión del riego y la salinidad en los cultivos de la Península de Santa Elena y la cuenca baja del Río Guayas. (p. 26). Presentado en XI Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo, Quito.
- Colmenero-Flores, J. M., Campos, F., Garcíarrubio, A., & Covarrubias\*, A. A. (1997). Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Molecular Biology*, 35(4), 393-405. <https://doi.org/10.1023/A:1005802505731>
- Derbyshire, E., Wright, D. J., & Boulter, D. (1976). Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry*, 15(1), 3-24. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89046-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89046-9)

- FAO, F. (Fidecomisos I. en R. con la A. (2016). Panorama Agroalimentario - Frijol 2016. Recuperado de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200638/Panorama\\_Agroalimentario\\_Frijol\\_2016.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200638/Panorama_Agroalimentario_Frijol_2016.pdf)
- Gebeyehu, S. (2006). *Physiological Response to Drought Stress of Common Bean (Phaseolus Vulgaris L.) Genotypes Differing in Drought Resistance*. Cuvillier Verlag.
- Hectors, K., Prinsen, E., De Coen, W., Jansen, M. A. K., & Guisez, Y. (2007). *Arabidopsis thaliana* plants acclimated to low dose rates of ultraviolet B radiation show specific changes in morphology and gene expression in the absence of stress symptoms. *New Phytologist*, 175(2), 255-270. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02092.x>
- Kuzdraliński, A., Szczerba, H., Tofil, K., Filipiak, A., Garbarczyk, E., Dziadko, P., ... Solarska, E. (2014). Early PCR-based detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. poae* on stem bases of winter wheat throughout Poland. *European Journal of Plant Pathology*, 140(3), 491-502. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0483-9>
- Lamichhane, J. R., & Venturi, V. (2015). Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: a growing trend. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00385>
- Lindemose, S., O'Shea, C., Jensen, M. K., & Skriver, K. (2013). Structure, Function and Networks of Transcription Factors Involved in Abiotic Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 5842-5878. <https://doi.org/10.3390/ijms14035842>

- M. Peralta, N. Rodriguez, E. Murillo, & N. Manzón. (2014). Catalogo de variedades mejoradas de frejol arbustivo (*Phaseolus vulgaris*) para los valles y estribaciones de la Sierra Ecuatoriana. *Publicación Miscelánea*, 146(Tercera Edición), 66.
- MANTILLA, I. S. G. (s. f.). GENERACIÓN DE GEOINFORMACIÓN PARA LA GESTIÓN DEL TERRITORIO A NIVEL NACIONAL COMPONENTE: “CLIMA, HIDROLOGÍA Y AMENAZAS HIDROMETEOROLÓGICAS”, 9.
- Mayor Duran, V. M. (2016). *Identificación de QTLs de frijol comun (Phaseolus vulgaris) asociados a tolerancia a sequía*. Universidad de Ciencias Agropecuarias.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería, & Cecilia Salazar. (2015). Boletín Situacional del Frijol, 8. Recuperado de [http://sipa.agricultura.gob.ec/phocadownloadpap/cultivo/2016/boletin\\_situacional\\_frejol\\_2015.pdf](http://sipa.agricultura.gob.ec/phocadownloadpap/cultivo/2016/boletin_situacional_frejol_2015.pdf)
- Morales-Abarca, L. F. (2018). PRODUCCIÓN Y PRODUCTIVIDAD DE LOS CULTIVOS DE FRIJOL Y MAÍZ EN COSTA RICA DE 1984 AL 2014, 4(1), 19. Recuperado de <https://www.researchgate.net/project/ANALISIS-DE-LA-PRODUCCION-AGROPECUARIA-EN-COSTA-RICA>
- Müller-Xing, R., Xing, Q., & Goodrich, J. (2014). Footprints of the sun: memory of UV and light stress in plants. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00474>
- Negrão, S., Schmöckel, S. M., & Tester, M. (2017). Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annals of Botany*, 119(1), 1-11. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw191>
- ORTEGA, B. K. A. (2016). *IDENTIFICACION DE PROTEINAS INVOLUCRADAS EN ESTRES BIOTICO Y ABIOTICO EN VARIEDADES COMERCIALES DEL*



*FREJOL COMUN (Phaseolus vulgaris ) DE ECUADOR*. Universidad de Guayaquil, Guayaquil. Recuperado de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/26688/1/T-UG-POS-MBM-0081%20ORTEGA%20MALDONADO.pdf>

Pandey, P., Irulappan, V., Bagavathiannan, M. V., & Senthil-Kumar, M. (2017). Impact of Combined Abiotic and Biotic Stresses on Plant Growth and Avenues for Crop Improvement by Exploiting Physio-morphological Traits. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00537>

Pérez Mora, W., Medhi Jazayeri, S., Romero, M., & Melgarejo, L. M. (2010). Metodo para la extraccion de proteinas en palma de aceite *Elaeis guineensis* Jacq para aplicacion en estudios de proteómica. (p. 4). Presentado en Primer Congreso Iberoamericano de Biotecnología y Biodiversidad, Colombia. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4057.8643>

Quintero, C. T., & Quijano, R. R. (s. f.). factores que merman su producción, 4.

RODRÍGUEZ, E. M. (s. f.). Errores frecuentes en la interpretación del coeficiente de determinación lineal, 7.

Salmanowicz, B. (2001). Phaseolin seed variability in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by capillary gel electrophoresis. *Journal of applied genetics*, 42, 269-281.

Torres Navarrete, E. D., Sánchez Laiño, A., Cedeño Briones, A., Haro Chong, A., Torres Navarrete, A., González Osorio, B., ... Reyes Bermeo, M. (2014). CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE FRIJOL EN LA PROVINCIA DE COTOPAXI ECUADOR: CASO COMUNA PANYATUG. *Ciencia y Tecnología*, 6(1), 23. <https://doi.org/10.18779/cyt.v6i1.176>

ULLOA, M. C. (2015). LOS SUELOS DEL ECUADOR, 54.