

Ra Ximhai

Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo
Sustentable

Ra Ximhai
Universidad Autónoma Indígena de México
México

2010

CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA DE GRANOS DE FRIJOL AZUFRAO (*Phamseolus vulgaris*) CULTIVADOS EN EL ESTADO DE SINALOA

Magda Karina Camacho Espinoza, Luz Isela Peinado Guevara, José Ángel López Valenzuela,
Ángel Valdez Ortiz, Rafael Atanasio Salinas Pérez, Claudia Graciela Moreno Herrera y Sergio
Medina Godoy

Ra Ximhai, enero-abril, año/Vol. 6, Número 1
Universidad Autónoma Indígena de México
Mochicahui, El Fuerte, Sinaloa. pp. 23-36



e-revist@s



CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA DE GRANOS DE FRIJOL AZUFRAADO (*Phaseolus vulgaris*) CULTIVADOS EN EL ESTADO DE SINALOA

PROTEOMIC CHARACTERIZATION OF SULFUR COMMON BEANS SEEDS (*Phaseolus vulgaris*) CULTIVATED IN SINALOA STATE

Magda Karina Camacho-Espinoza¹; Luz Isela Peinado-Guevara²; José Ángel López -Valenzuela³; Ángel Valdez-Ortiz³; Rafael Atanasio Salinas-Pérez⁴; Claudia Graciela Moreno-Herrera⁵; Sergio Medina-Godoy⁵

¹Estudiante, Departamento Académico de Ciencias Biológicas de la Universidad de Occidente. Unidad Guasave, Av. Universidades s/n, Guasave, Sinaloa. ²Estudiante, Programa Regional del Noroeste para el Doctorado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa; Laboratorio de Alimentos Funcionales, Departamento de Biotecnología Agrícola, CIIDIR-IPN-Unidad Sinaloa, Guasave Sinaloa. ³Profesor Investigador, Programa Regional del Noroeste para el Doctorado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa. ⁴Investigador, Campo Experimental Valle Del Fuerte, Carretera Internacional México-Nogales KM. 1609, Ahome, Sinaloa. ⁵Profesor Investigador, Laboratorio de Alimentos Funcionales, Departamento de Biotecnología Agrícola, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Sinaloa. Apdo. Postal 280, Guasave, Sinaloa 81101, México. smedinam@ipn.mx.

RESUMEN

En México el frijol es el grano fundamental de la dieta de la población por muchos siglos. Las características distintivas de los genotipos frijol pueden ser el resultado de la composición proteica de cada uno de ellos y la proteómica es una herramienta que incluye la caracterización de la expresión de las proteínas y de sus propiedades funcionales y estructurales. Se empleó esta estrategia para caracterizar tres principales materiales de frijol cultivados en Sinaloa. Se optimizó un método de extracción basado en precipitación con TCA/acetona, que permitió el análisis bidimensional de proteínas. Al comparar los genotipos Azufrado Regional 87, Azufrado Higuera y Noroeste: se encontró que existe una mayor homogeneidad entre las variedades Az. Higuera y Az. Noroeste, pero no así entre estas y la variedad Az. Regional 87. Este trabajo puede considerarse como el primer reporte donde se emplea proteómica para caracterizar granos de frijol.

Palabras clave: Variación genética, faseolina, glicinina, electroforesis, extracción de proteínas.

SUMMARY

In Mexico, common bean grain has been used for centuries in Mexican population diet. The organoleptic and nutritional properties and other characteristics are related to protein composition. Proteomics approaches have been employed to detected genetic variation of soybean and other crops, but there is not a report of this technologies applied to common beans. The proteomics characterization of three genotypes of common bean produced in Sinaloa was realized. The genotypes: Azufrado Higuera, Azufrado Noroeste and Azufrado Regional 87 were evaluated. A protein extraction protocol based on TCA/acetone precipitations was optimized in order to perform Two-dimensional gel electrophoresis. Gels analysis shown significant differences between all the genotypes, but a strong homology was detected between Azufrado Higuera and Azufrado Noroeste seed storage proteins, but not with

Azufrado Regional 87. These results are the first attempt to employ proteomics technique to common beans studies.

Key Word: Genetic variation, faseolin, glycinin, electrophoresis, protein extraction.

INTRODUCCIÓN

El frijol es la leguminosa alimenticia más importante para cerca de 300 millones de personas, que en su mayoría viven en países en desarrollo. El frijol se considera como la segunda fuente de proteína en África y la cuarta en América tropical. Genera ingresos para millones de pequeños agricultores, a tal grado que la producción mundial anual es de cerca de US \$11 mil millones. La mayor parte de la producción mundial se destina a abastecer la demanda interna de los países productores. A nivel mundial, a partir de la década de los 90s la superficie sembrada de frijol ha experimentado una disminución aproximada del 13%. Sin embargo, el comportamiento de la producción y, por consiguiente, la productividad, no han desarrollado la misma tendencia, ya que estas dos se han incrementado a través del tiempo en los países que se dedican a este cultivo, debido a la utilización de variedades mejoradas de mayor producción en los países que orientan su producción hacia la exportación (Myanmar, China y Estados Unidos) (Velázquez *et al.*, 2005).

En frijol común se ha reportado contenidos de proteína de 16-33% (Meiners *et al.*, 1976). La variación genética del porcentaje de proteína

depende de los genes que controlan la síntesis y acumulación de una fracción específica de proteína y de genes que controlan otros factores como el suministro de nutrimentos, vigor de la planta, maduración, tamaño y rendimiento de la semilla, y la acumulación y síntesis de almidón en la semilla (Osborn y Brown, 1988). La localización geográfica y la época de crecimiento juegan un papel determinante en el contenido de proteína; estos factores deben ser considerados al analizar el control genético del contenido de proteína para determinar en qué grado las diferencias observadas tienen causas genéticas o ambientales. La proteína de reserva mayoritaria corresponde a una globulina 7S (soluble en soluciones salinas) denominada faseolina (Sathe *et al.*, 1984).

La calidad nutricional de las proteínas es influenciada por el patrón de los aminoácidos y la digestibilidad, así como la cantidad y calidad de otras proteínas consumidas; el frijol se caracteriza por su deficiencia en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y triptófano. Estos componentes presentan baja digestibilidad *in vitro* debido a la presencia de inhibidores de proteasas. Los complejos almidón-proteína, las interacciones proteína-proteína y la presencia de fitatos y taninos (Bressani, 1975; Romero y Ryan, 1978). Además, la estructura y la presencia de otros componentes de la semilla (almidón, hemicelulosa, minerales, polifenoles) tienen efecto en la digestibilidad (Desphande *et al.*, 1989). La digestibilidad del frijol fresco oscila de 25 a 60%, pero el frijol cocido presenta un rango de 65-85% dependiendo de la variedad y del método de cocción utilizado (Chang *et al.*, 1981). A pesar de la gran importancia del cultivo, la caracterización de proteínas entre genotipos no ha sido cubierta, salvo lo referente a proteínas particulares como el caso de las faseolinas o argelinas (Montoya *et al.*, 2008).

Las principales proteínas en la semilla de frijol común son denominadas faseolina, lectinas y argelinas (Osborn y Brown, 1988). La faseolina es la principal fracción proteínica del frijol cultivado y representa 40-60% de la proteína total. Es una globulina soluble en soluciones salinas (NaCl 0.5M) a casi cualquier pH. La faseolina está glicosilada con 3-5% de azúcares

y contiene residuos ácidos y aminos, y alrededor del 1% de residuos que contienen azufre (Sun y Tall, 1975).

Además de las mencionadas, se han descrito otras proteínas de frijol común fraccionaron las proteínas de frijol común de varios cultivares líneas, basándose en su solubilidad. Como porcentaje de la proteína total, estas líneas contienen 36-46% de globulina-1 (faseolina), 5-12% de globulina-2 (predominantemente lectinas), 12-16% de albúminas, 2-4% de prolaminas y 20-30% de proteína soluble en alcalina. Sathe *et al.*, (1985), reportó que las albúminas y las globulinas representaban 21.2 y 71.4% respectivamente, de las proteínas totales de frijol (Ma y Bliss, 1978).

Las argelinas son proteínas que fueron localizadas en el frijol común silvestre en la población de Argelia (Guerrero, México), aunque también pueden encontrarse en líneas que contienen faseolina y lectinas; precipitan como una proteína G2 aunque se ha reportado su presencia en albúminas y globulinas (Romero-Andreas *et al.*, 1986). Poseen subunidades con pesos moleculares entre 35 kDa y 42 kDa, dependiendo de la variante, la proteína nativa tiene un peso molecular de 80 kDa, correspondiendo a un dímero de subunidades polipeptídicas, las dos proteínas tienen pesos moleculares similares y casi idéntico peso molecular cuando deglicosiladas. La composición química de las argelinas contiene más metionina, cisteína y residuos básicos de aminoácidos y más residuos glicosilados (Osborn y Brown, 1988).

Faseolina es un determinante principal tanto de cantidad como de la calidad alimenticia de proteínas en el frijol de siembra. Al igual que otras proteínas de semilla de la familia de esta leguminosa, faseolina es deficiente en contener aminoácidos con azufre, como metionina. Las proteínas de semilla de cereales generalmente contienen aminoácidos suficientes con grupos sulfhidrilo, pero son deficientes en otros aminoácidos esenciales como lisina. El consumo combinado de cereales y legumbres generalmente alivia estas carencias mutuas que aseguran una dieta equilibrada cuando los

cereales y legumbres son consumidos en la proporción de 2:1.

La proteómica es la nueva etapa en la investigación biológica que emana naturalmente de la genómica y que incluye la caracterización de la expresión de las proteínas codificadas por un genoma y el establecimiento de sus propiedades funcionales y estructurales. Esta estrategia ha sido empleada para el estudio de soya y chícharo para dilucidar diferencias entre variedades. Esto muestra la capacidad de esta técnica para determinar diferencias entre genotipos y tener una mejor caracterización de estos materiales que puedan ser empleado para la generación de variedades mejoradas. Esto es una tecnología clave para el estudio de sistemas biológicos sumamente complejos y dinámicos (Chen y Harmon, 2006). Las principales tecnologías usadas en la proteómica son las siguientes: tecnología reproducible de electroforesis en geles de dos dimensiones (2D); tecnología de tinción y análisis de los geles; tecnología para la identificación de las proteínas, tal como la espectrometría de masas, bases de datos (genoma y proteína) (Mojica *et al.*, 2003).

La proteómica ha sido empleada para el estudio de las diferencias entre genotipos de frijol soya (Natarajan *et al.*, 2005), donde se encontró e identificó diferencias en las dos proteínas de almacenaje principales: β -conglycinina y glicinina, en semillas soya silvestre (*Glycine soja*) y cultivado (*Glycine max*) de soya. La mayor parte de las subunidades de β -conglycinina eran bien separado en el pH se extienden 3.0-10.0, mientras polipéptidos ácidos y básicos glicinina fueron bien separados en el pH se extiende 4.0-7.0 y 6.0-11.0, respectivamente. Aunque el modelo de distribución total de las manchas de proteína fuera similar tanto en genotipos la utilización del pH 3.0-10.0, variaciones en el número como en la intensidad de manchas de proteína fue resuelta usando una combinación de pH 4.0-7.0 y el pH 6.0-11.0. El número total de manchas de proteína de almacenaje descubiertas en genotipos silvestres y cultivados era aproximadamente 44 y 34, respectivamente.

Fukuda *et al.*, (2005), estudiaron soya cultivada (*Glycine max*) y soya silvestre (*Glycine soja*) estas pueden ser cruzadas con ellos para producir descendencia fértil. Lo anterior con el objeto de incrementar la variación mayor genética, sugiriendo la posibilidad que soya silvestre contienen proteínas de almacenaje con propiedades diferentes y de mejor calidad que las encontradas en las variedades cultivadas. Se analizó el patrón electroforético de 390 líneas de soya silvestre y se encontraron algunas líneas que con variantes electroforéticas de las principales glublinas: glicinina y la subunidad β -conglycinina: una línea que contiene una pequeña subunidad alfa de β -conglycinina y dos y cinco líneas que contienen subunidad A3 pequeña y subunidad A4 grandes de glicinina, respectivamente. Estas variaciones de las β -Conglycinina y glicinina encontradas en las variedades silvestres tienen el potencial de ser empleados en el mejoramiento genético de variedades cultivadas de soya, con el objetivo de impartir nuevas propiedades a las proteínas de este grano.

Natarajan *et al.*, (2005), reportaron el análisis proteómico para la separación, identificación y la comparación de dos proteínas principales de almacenaje: β -conglycinina y glicinina, en semillas de soya silvestre (*Glycine soja*) y cultivado (*Glycine max*). La mayor parte de las subunidades de β -conglycinina se separaron en el pH 3.0-10.0, mientras polipéptidos ácidos y básicos glicinina fueron bien separados en el pH que se extiende 4.0-7.0 y 6.0-11.0, respectivamente. Aunque el modelo de distribución total de spots de proteína fue similar tanto en genotipos la utilización del pH 3.0-10.0, las variaciones en el número como en la intensidad de los spots de proteína fue resuelta usando una combinación de pH 4.0-7.0 y el pH 6.0-11.0. El número total de spots de proteína de almacenaje descubiertas en genotipos silvestre y cultivado fue aproximadamente 44 y 34, respectivamente. Este fue el primer estudio que reporta la comparación de los perfiles de proteína de genotipos de semillas de soya silvestre y cultivada usando proteómica.

Natarajan *et al.*, (2006), investigaron los perfiles proteómicos y geonómicos de glicinina, una

familia de proteínas de almacenaje en 16 diferentes genotipos de soya. Observaron la variación considerable en las cinco subunidades glicinina, G1, G2, G3, G4 y G5 usando el análisis proteómico y genómico. El análisis mostró que genotipos de soya silvestre muestran una gama de 25-29 glicinina los spots de proteína que incluyó tanto polipéptidos ácidos como básicos seguidos de 24-28, moderno con 24e25, y 1 con 17e23 manchas de proteína. En el Estado de Sinaloa, el frijol azufrado constituye la principal variedad cultivada y consumida debido a su amplia aceptación del mercado regional. La demanda de nuevas variedades que cumplan con las demandas del consumidor y también con características agronómicas deseables. Por lo anterior, es necesario identificar aquellas proteínas en el grano responsables de las propiedades representativas de las variedades de frijol azufrado producidas en el Estado.

A la fecha no existe reporte del estudio de las proteínas de grano de frijol a nivel proteómico, lo anterior permitirá estudiar de manera más profunda la composición de las proteínas de frijol, así como también las variaciones que existen entre los genotipos actuales. El presente trabajo tiene como objetivo caracterizar mediante proteómica los principales genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris*) cultivados en Sinaloa, enfocándose en una primera etapa en los materiales azufrados y demostrar el potencial de esta técnica en la caracterización de este material.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los aislados de proteínas provienen de tres harinas extraídas de diferentes variedades de frijol: Azufrado Higuera, Azufrado Noroeste y Azufrado Regional 87 (Figura 1). Estas variedades son cultivadas en el Campo Experimental del Valle del Fuerte del INIFAP en el Estado de Sinaloa.

Extracción de proteínas de semillas

Las semillas de frijol fue triturada con mortero y pistilo en presencia de nitrógeno líquido, posteriormente fue pulverizado en un molino (Retsh MM 301) por 5 minutos a velocidad de

30 oscilaciones/s . La harina fue almacenada a -70°C. Harina de frijol (0.5 g) fue homogeneizada con 10 mL de una solución que contiene ácido tricloroacético al 10% (p/v) en acetona suplementado con 2-mercaptoetanol (2-MB) a 0.07% (v/v). La proteína total fue precipitada por toda la noche a -20 °C. El extracto fue centrifugado a 20,800g durante 20 minutos a 4 °C en una Centrifuga Avanti-j301, rotor 25.50 (Beckman Coulter). La pastilla fue lavada en dos ocasiones con acetona que contiene el 0.07% (v/v) 2-MB. Después de lavar la pastilla fue centrifugada. Se tiro el sobrenadante y la pastilla fue secada bajo condiciones de vacío por una hora. La pastilla ya seca fue resuspendida en 3 ml de amortiguador de lisis (Urea 7 M, Tiourea 2 M, 1% CHAPS y 2 %DTT) de acuerdo a Natarajan *et al.*, (2006). Para solubilizar las proteínas se utilizó un sonicador (Ultrasonic Procesador, Model CP 50) por 30 minutos. La proteína solubilizada se recuperó mediante centrifugación a 20,800g durante 25 minutos a 20°C, donde se recuperó el sobrenadante que contiene las proteínas. Las proteínas se almacenaron en alícuotas de 500µL en tubos eppendorf las cuales se almacenaron a -70 °C. Las concentraciones de proteínas se determinaron usando el método de Bradford (Sigma Bradford Reagent) y las lecturas de absorbancia (495 nm) se obtuvieron en un lector multimodal DTX 880 (Beckman Coulter). Como estándar se empleo albúmina de suero bovina (Sigma-Aldrich).



Figura 1. Genotipos de frijol Azufrado.

Electroforesis desnaturalizante (1D SDS-PAGE)

Con este método las proteínas se separan de acuerdo a su peso molecular. La proteína total extraída de las tres distintas harinas se analizó mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). 10ug de cada muestra se resolvieron bajo condiciones reductoras (2-BM) y no reductoras en un gel al 10% de acrilamida (Laemmli UK, 1970). Como marcador de peso molecular se emplearon 5 µL de BenchMark Protein Ladder. Las proteínas se separaron en una cámara de electroforesis vertical Miniprotean (Bio-Rad) en geles de 1.5 mm de grosor por 2:45 horas, a 80 V y 80 mA. Las proteínas separadas se tiñeron con solución de tinción (azul de Coomassie R-250 (0.1%), metanol 45 %, ácido acético glacial 45%, con agitación suavemente por toda la noche, después se destiñó en solución de desteñido (ácido acético glacial 10% y metanol 10%), se dejó agitando por 24 horas. Las proteínas se fotodocumentaron con el sistema: ChemiDoc (Bio-Rad) y las proteínas analizadas con el software Quantity-One.

Electroforesis Bidimensional (2D-SDS-PAGE)

Con esta técnica las proteínas se separan por su pH (electroisoelectroforesis) y por su peso molecular, esta separación se hace en presencia de SDS. Durante el electroisoelectroforesis (IEF) (1ra. dimensión) las proteínas solubilizadas en buffer de rehidratación (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, trazas de azul de bromofenol, anfolitos, DTT 40 Mm), 80 µg de proteína /125 µL de buffer de rehidratación se aplicaron a tiras de 7 cm y rango de pH 3-10 (ReadyStrip, IPG Strips, BIO-RAD). Las tiras se cubrieron con aceite mineral y se enfocaron el sistema Protean IEF cell (BIO-RAD Laboratorios), a 20 °C, 50 µA/tira, VH 18000. Posterior a la electroforesis se almacenaron a -20 °C, (Takako, 2005).

Separación por peso molecular: 2D SDS-PAGE

Para separar las proteínas en base a su peso molecular, estas se someten a una etapa de acondicionamiento para la electroforesis

desnaturalizante (SDS-PAGE), donde las proteínas son tratadas con el detergente SDS y los grupos disulfuro son bloqueados. Las tiras se equilibraron con Buffer de equilibrio I (urea 6 M, tris-HCl pH 8.8 5 mM, SDS 2%, glicerol 20%, DTT 2% (p/v)) y Buffer de equilibrio II (urea 6 M, tris-HCl pH 8.8 5 mM, SDS 2%, glicerol 20%, Yodoacetamina al 2.5% (p/v)). Las proteínas en las tiras se mantuvieron por 15 minutos en cada solución. Posteriormente las tiras se colocaron en la parte superior de un gel SDS-PAGE al 12%. El gel se corrió por 1:50 horas en una cámara de electroforesis, a 80V y 80µA. La visualización de proteínas se realizó como se describió anteriormente. Se realizarán tres geles por cada muestra. Las imágenes fueron documentadas como se describió anteriormente y las imágenes se analizarán con el Software PDQuest- (Bio-Rad).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de proteínas

La extracción de proteínas de las distintas harinas de frijol con el método reportado por Natarajan *et al.*, (2006) fue adecuada en términos de rendimientos, en la muestra de harina de la variedad Azufrado Regional 87 mostró la menor concentración 5.51 µg/µL, seguido de la harina de Azufrado Higuera con 7.146 µg/µL y con mayor redimiendo la harina de Azufrado Noroeste con 6.948 µg/µL. Si se considera que se obtuvieron cerca de 3 mL de cada una de estas muestras, con el método empleado se obtuvo suficiente proteína para los experimentos planteados. Para verificar si las proteínas no se encuentran degradadas o determinar si no existen contaminantes, estas se separaron en un gel bajo condiciones desnaturalizantes.

Electroforesis desnaturalizante (1D-SDS-PAGE)

En la Figura 2 se muestran las proteínas de los tres genotipos tanto bajo condiciones reductoras como no reductoras. Se observó que las proteínas predominantes que se encontraron en las extracciones de los tres genotipos de frijol, son las proteínas de peso molecular 50 kDa y de

30 kDa. Las primeras corresponden a la familia de las proteínas de las faseolinas, mientras en las otras corresponden al peso molecular de las lectinas.

Al observar el patrón electroforético de las proteínas con y sin agente desnaturante, se encontraron pocas diferencias, lo que significa que las proteínas no están unidas en gran medida por puentes disulfuro, entre las variedades se observan pocas diferencias con la ayuda de estos geles. Cabe mencionar que la mayoría de los reportes de caracterización de las proteínas de reserva de frijol se basan en el empleo de este mismo de electroforesis y se tienen que incluir materiales muy contrastantes para identificar diferencias entre ellos; por lo que es de interés para determinar diferencias empleando electroforesis bidimensional (2D SDS-PAGE).

Electroforesis bidimensional (2D-SDS-PAGE)

En la Figura 3 se observan las proteínas de los tres distintos genotipos separados de acuerdo a Natarajan *et al.*, (2006), se indica un barrido horizontal de las proteínas más abundantes en los distintos genotipos. Por lo anterior, se decidió precipitar las proteínas con etanol (1 vol de muestra: 4 vol de etanol absoluto), y la proteína se resuspendió con el reactivo: Destreak Solution (Amersham Bioscience), el cual es empleado para reducir barridos horizontales. Después de resuspender las muestras de proteínas en Destreak Solution y realizar la separación bidimensional tal como se realizó con el método original, se continuó observando un barrido horizontal, pero en este caso fue posible visualizar mas proteínas (Figura 4).

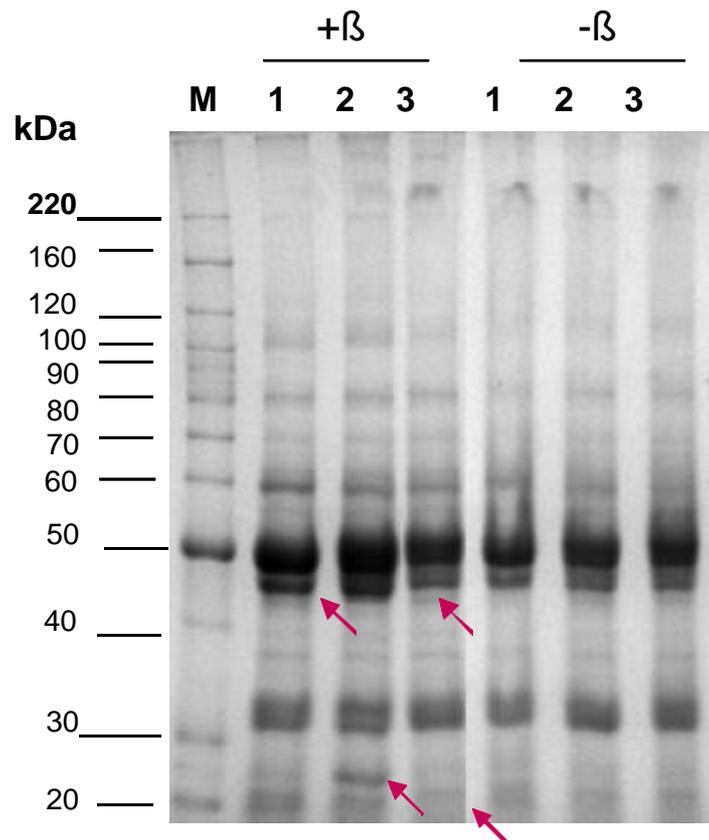


Figura 2. Electroforesis 1D SDS-PAGE de proteína total de grano de frijol. M, Marcador de Peso Molecular. Carril 1: Azufrado Regional 87, carril 2: Azufrado Higuera, Carril 3: Azufrado Noroeste. Con 2-Betameraptoetanol (+β) y sin 2-Betameraptoetanol (-β), 10 μg de proteína en cada carril. Las flechas indican diferencias entre los genotipos.

En estas muestras probablemente estaban contaminadas con ácidos nucleicos, o azúcares, los cuales no permiten la correcta separación de las proteínas y genera que se continúe observando un barrido horizontal en las proteínas más abundantes, por lo cual se utilizó el kit 2D Clean-up (Amersham Biosciences) para eliminar contaminantes de las proteínas. Con este kit se observó mayor resolución de proteínas (Figura 5) y este patrón se observó para los tres genotipos estudiados. Con este resultado, se procedió a realizar la electroforesis por triplicado para el análisis en el programa PDQuest (BioRad).

Análisis comparativos

La comparación de resultados se muestra de dos maneras: una grafica mediante el solapamiento de geles promedio de dos variedades en un gel "Master" o en un cuadro, donde se enumeran la cantidad de proteínas detectadas diferencialmente. En el análisis de la comparación se describen cuatro resultados: Cualitativas, que significa que una proteínas está presente en un genotipo y en otro no; Cuantitativas, proteínas que están presente en mayor o menor abundancia, pero sin diferencia estadísticamente significativa; y aquellas que presentan una significancia estadísticas mediante la prueba *t-student* o mínimos cuadrados.

Análisis comparativo entre Az. Regional 87 vs Az. Higuera

En la Figura 6, se muestran los perfiles promedio de los genotipos Az. Regional 87 y Az. Higuera (Figura 6A y 6B, respectivamente). En la Figura también se observan las diferencias encontradas en el análisis en el gel Master (Figura 6C). En la Cuadro 1 se muestran los spots identificados diferencialmente en cada análisis. 33 proteínas están presentes de manera cualitativa y 50 de manera cuantitativa, con respecto a las proteínas que presentaron variaciones de manera significativa 38 fueron por el método *t-student* y 26 por el método de mínimos cuadrados. Se encuentran grandes diferencias entre estos genotipos, por lo que las características de estas podrán ser de interés, Nataranjan *et al.*, (2006) reportaron un número similar de proteínas

diferenciales en soya al comparar variedades silvestres contra cultivadas. En nuestro caso la diferencias encontradas pueden deberse a que en frijol existen una mayor variabilidad genética aun en variedades cultivadas.

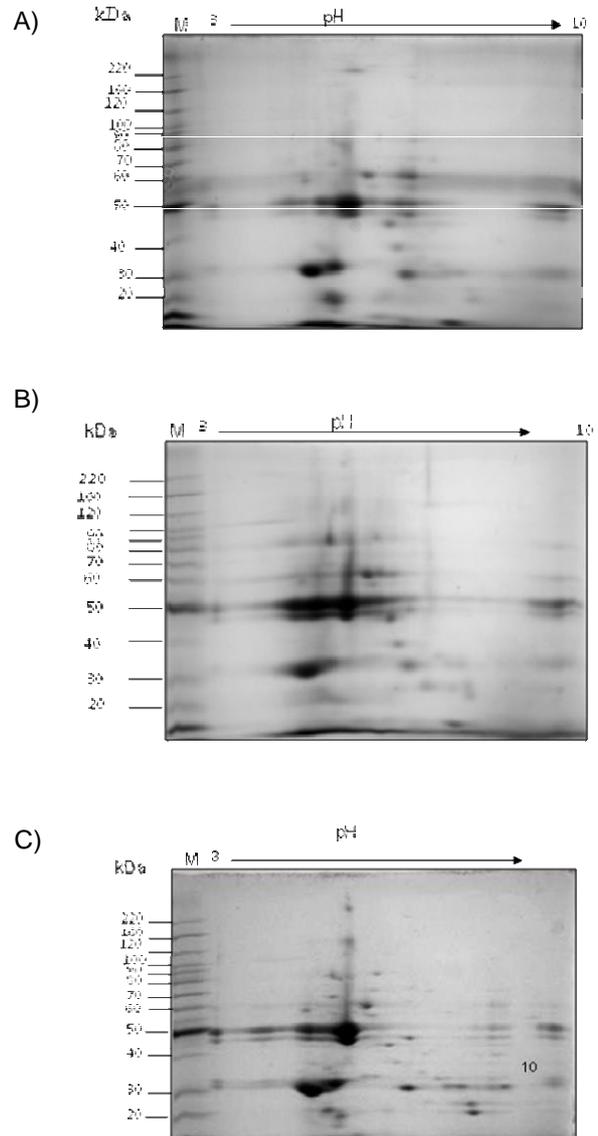


Figura 3. Electroforesis bidimensional de proteínas de frijol azufrado acuerdo a Nataranjan et al (2006). A) Azufrado Regional 87; B) Azufrado Higuera; C) Azufrado Noroeste. 80 µg de proteínas fueron aplicadas en tiras de 7 cm de rango de pH 3-10.

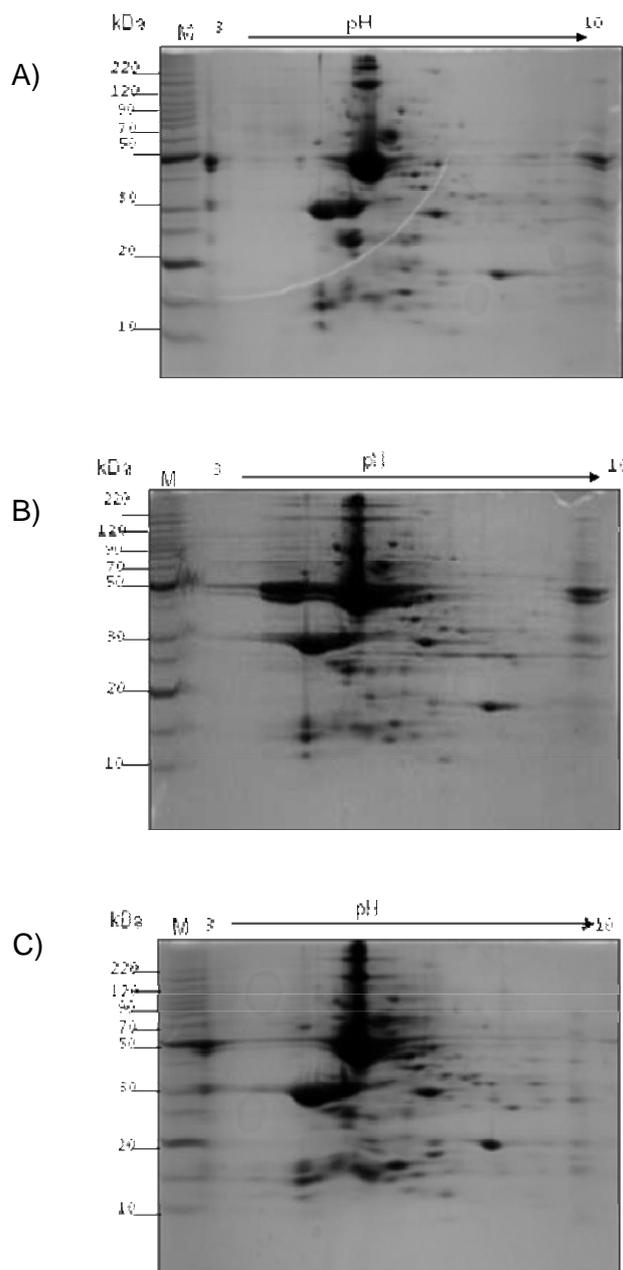


Figura 4. Electroforesis bidimensional de proteínas tratadas con el reactivo Destreak Solution. A) Azufrado Regional 87; B) Azufrado Higuera; C) Azufrado Noroeste. 80 ug de proteínas fueron aplicadas en tiras de 7 cm de rango de pH 3-10.

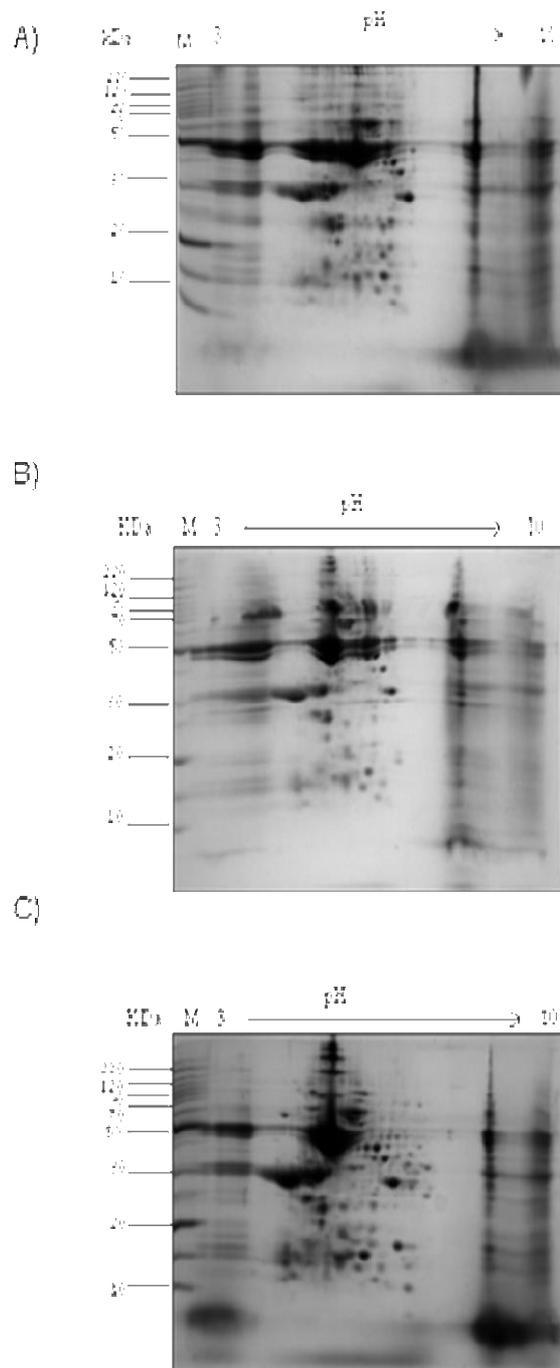


Figura 5. Electroforesis bidimensional de proteínas tratadas con el kit 2D- Clean Up. A) Azufrado Regional 87; B) Azufrado Higuera; C) Azufrado Noroeste. 80 ug de proteínas fueron aplicadas en tiras de 7 cm de rango de pH 3-10.

Análisis comparativo entre Azufrado Regional 87 vs Azufrado Noroeste

En la Figura 7 se muestra la comparación de los geles Master de los genotipos Az. Regional 87 y Az. Noroeste. En la Figura también se observan las diferencias encontradas en el análisis. En la Cuadro 1 se muestran los spots identificados en cada análisis. 29 proteínas están presentes de manera cualitativa y 68 de manera cuantitativa, con respecto a las proteínas que presentaron variaciones de manera significativa 34 fueron por el método *t*-student y 24 por el método de mínimos cuadrados. En este caso, las diferencias de proteínas encontradas son muy similares al caso anterior, como se discutirá más adelante, los patrones electroforéticos de los genotipos Az. Higuera y Noroeste son muy similares. Resultando en este caso el frijol Az. Regional 87 el genotipo mas contrastante.

Análisis comparativo entre Azufrado Higuera vs Azufrado Noroeste

En la Figura 8 se muestra la comparación de los geles Master de los genotipos Az. Higuera y Az. Noroeste. También se observan las diferencias encontradas en el análisis. En la Cuadro 1 se muestran los spots identificados en cada análisis. Solamente 2 proteínas están presentes de manera cualitativa, es decir que se encuentran en Az. Higuera y no en Az. Noroeste, además, las proteínas que presentaron variaciones de manera estadísticamente significativa 6 fueron por el método *t*-student ($p=0.05$) y 6 por el método de mínimos cuadrados ($p=0.05$), estas diferencias para dos materiales distintos pueden considerarse bajas. De las proteínas detectadas 47 fueron de manera cuantitativa. En este caso las diferencias son pequeñas con respecto a los dos casos anteriores, aun cuando estos dos genotipos presentan una genealogía distinta (Rosales-Serna *et al.*, 2006), de las tres variedades estas dos son las más similares entre sí.

Cuadro 1. Análisis comparativo entre los distintos genotipos.

Análisis	Az. Higuera vs Az. Noroeste	Az. Regional 87 vs Az. Noroeste	Az. Regional 87 vs Az. Higuera
Cualitativas	2	29	33
Cuantitativas	47	68	50
Prueba <i>t</i> -student ¹	6	34	38
Prueba de mínimos cuadrados ¹	8	24	26

¹p = 0.05

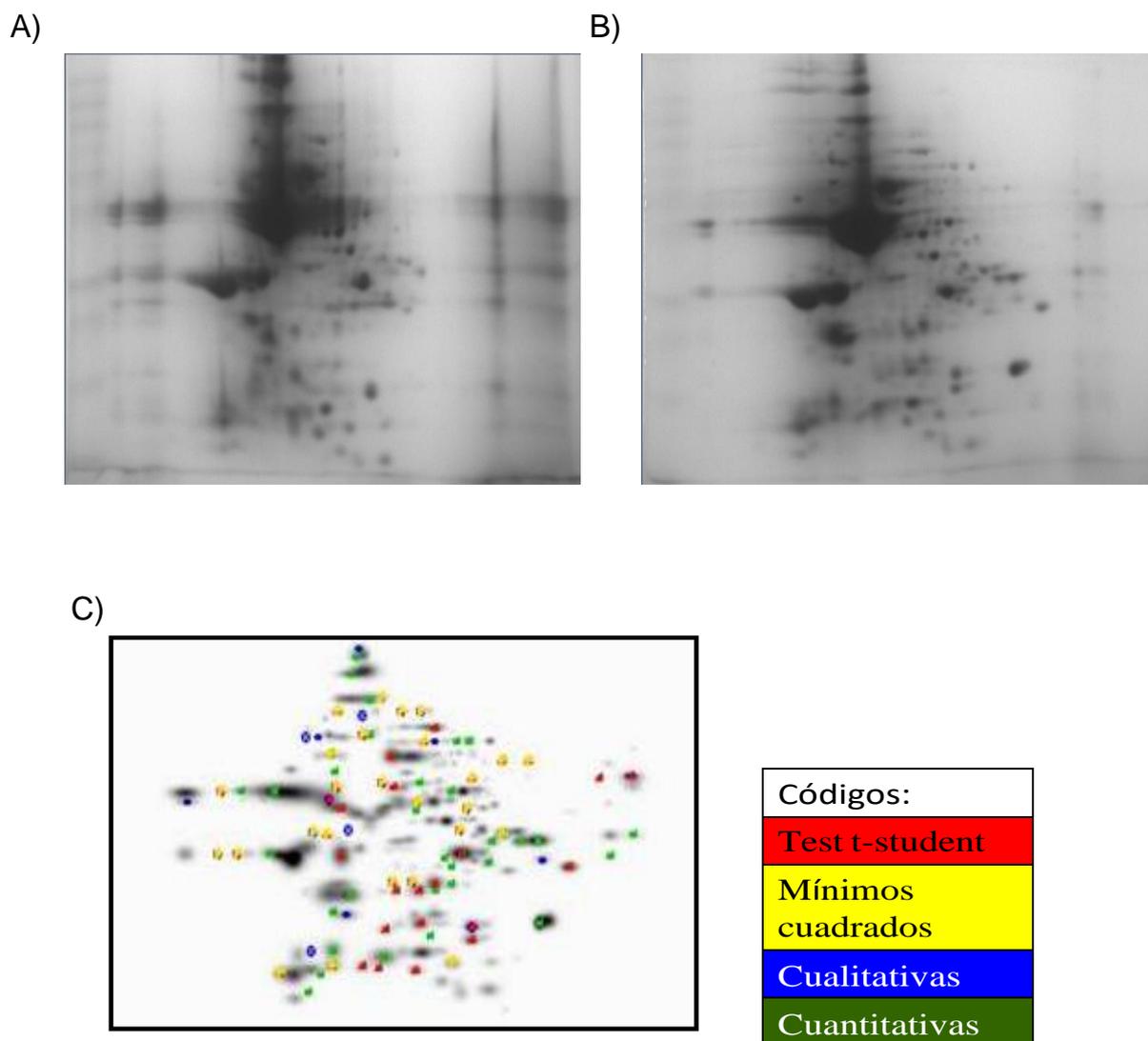


Figura 6. Análisis comparativo de los genotipos Az. Regional 87 vs Az. Higuera. A) Gel promedio Az. Regional 87; B) Gel Promedio de Az. Higuera. C) Gel Master Az. Regional 87 vs Az. Higuera.

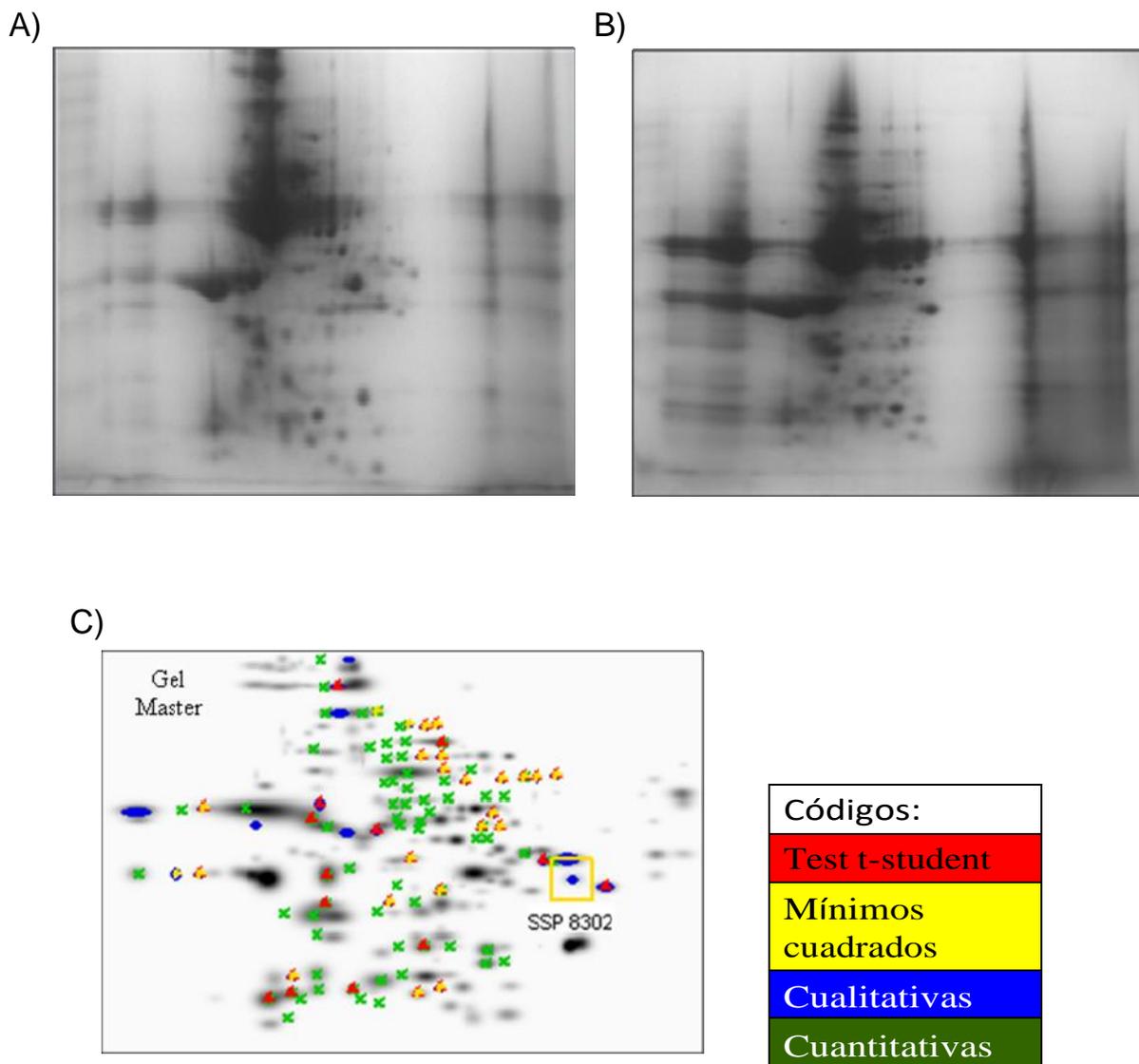


Figura 7. Análisis comparativo de los genotipos Az. Regional 87 vs Az. Noroeste. A) Gel promedio Az. Regional 87; B) Gel Promedio de Az. Noroeste. C) Gel Master Az. Regional 87 vs Az. Noroeste.

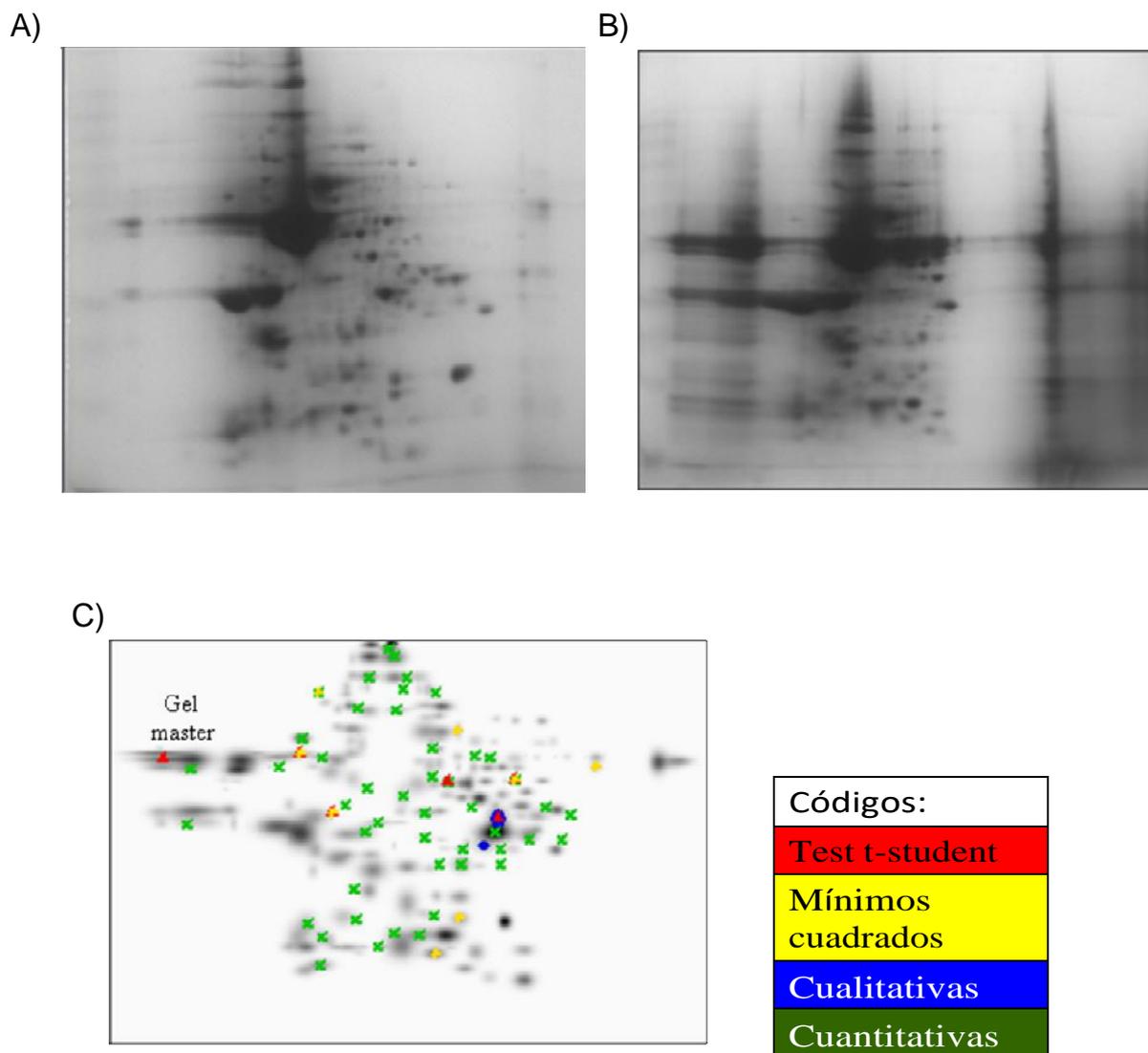


Figura 8. Análisis comparativo de los genotipos Az. Higuera vs Az. Noroeste. A) Gel promedio Az. Higuera; B) Gel Promedio de Az. Noroeste. C) Gel Master Az. Higuera vs Az. Noroeste.

CONCLUSIONES

Con el método de Natarajan y colaboradores y tratando las proteínas con el kit *2D Clean-up*, es posible separar las proteínas en geles 2D SDS-PAGE para su análisis.

Al comparar los genotipos Azufrado Regional 87, Azufrado Higuera y Noroeste se encontró que existe una mayor homogeneidad entre las Az. Higuera y Az. Noroeste, pero no así entre estas y el genotipo Az. Regional 87.

El análisis proteómico permitirá en el futuro la caracterización bidimensional de las proteínas de los distintos materiales genéticos de frijol con que se cuenta, y permitirá su empleo para encontrar nuevas propiedades nutricionales, nutraceuticas en distintos materiales y su incorporación mediante técnicas de mejoramiento genético.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a SIP-IPN, COFAA-IPN, Fundación Produce Sinaloa 2008 y Fondo Mixto CONACYT-Gobierno del Estado de Sinaloa Proyecto: Sin-2007-C01-70023, por el apoyo económico recibido para este estudio.

LITERATURA CITADA

- Bressani, R. 1975. **Legumes in human diets and how they might be improved.** *In:* Nutritional improvement of food legumes by breeding. pp. 15-42. Ed. M. Milner John Wiley & Sons, N.Y.
- Chang, K.C., and Satterle, L.D. 1982, **Chemistry of dry bean proteins.** *Journal of Food Processing and Preservation.* 6(4):203-25.
- Chen, S., and Harmon, A.C. 2006. **Advances in plant proteomics.** *Proteomics.* 6(20):5504-16.
- Deshpande, S. S., and Demondaran, S. 1989. **Structure- digestibility relationship of legume 7S proteins.** *Journal of Food Science.* 54(1): 108-13.
- Fukuda, T., Maruyama, N., Kanazawa, A., Abe, J., Shimamoto, Y., Hiemori, M., Tsuji, H., Tanisaka, T., Utsumi, S. 2005. **Molecular analysis and physicochemical properties of electrophoretic variants of wild soybean *Glycine soja* storage proteins.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53(9):3658-65.
- Ma, Y., and Bliss, F.A. 1978. **Seed proteins of common bean.** *Crop Science.* 18:431-37.
- Meiners, C. R., Derise, M. C., Lau, H. C., Ritchey, S. J., and Murphy, E.W. 1976. **The content of nine mineral elements in raw and cooked mature dry legumens.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 24(6):1126-30.
- Mojica T., Sánchez O., y Bobadilla, L. 2003. **La proteómica. La otra cara de la genómica.** *Nova.* 1(1):12-6.
- Montoya, C. A., Leterme, P., Victoria N.F., Toro O., Souffrant, W.B., Beebe, S., Lallès J.P. 2008. **Susceptibility of phaseolin to in vitro proteolysis is highly variable across common bean varieties (*Phaseolus vulgaris*).** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 56(6):2183-2191.
- Natarajan, S., Chenping, X., Hanhong, B., Thomas, J., Caperna., y Wesley, M. G. 2005. **Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins.** *Analytical Biochemistry.* 342(2):214-20.
- Natarajan, S., Chenping, Xu., Hanhong, B., Thomas, J., Caperna., y Wesley, M. G. 2006. **Characterization of Storage Proteins in Wild (*Glycine soja*) and Cultivated (*Glycine max*) Soybean Seeds Using Proteomic Analysis.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 54(8):3114-20.
- Osborn, T. C., y Brown, J.W.S. 1988. **Genetic control of bean seed protein.** *Critical Reviews in Plant Science.* 7(1):93-116.
- Romero, J., y Ryan, D.S. 1978. **Susceptibility of the major protein storage of the beans, *Phaseolus vulgaris* L, to in vitro enzymatic.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 26(4):784-8.
- Romero-Andreas, J., Yandell, B. S., Bliss, F. A. 1986. **Bean arcelin-1. Inheritance of a novel seed protein of *Phaseolus vulgaris* L. and its effect on seed composition.** *Theoretical and Applied Genetics* 72(1):123-128
- Rosales, S. R., Acosta, G. J. A.; Muruaga, M. J. S., Hernández, C. J. M., Esquivel, E.G., y Pérez, H. P. 2006. **Variedades mejoradas de frijol del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.** Centro de Investigación Regional del Centro Campo Experimental Valle de México. p. 148. (Libro Técnico Núm. 6).
- Sathe, S. K., Deshpande, S. S., y Salunkhe, D. K. 1984. **Dry beans of *Phaseolus*. A review. Part. 1. Chemical composition: Proteins.** *Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition.* 20(1):1-46.
- Sathe, S. K., Deshpande, S. S., and Salunkhe, D. K. 1985. **Dry beans of *Phaseolus*. A review. Part. 1. Chemical composition: Carbohydrates, fiber, minerals, vitamins and lipids.** *Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition.* 21(1):41-93.
- Sun, S. M., y Hall, T. C. 1975. **Solubility characteristics of globulins from *Phaseolus vulgaris* in regard to their isolation and characterization.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 23(2):184-189.
- Takako, F. 2005. **Molecular analysis and physicochemical properties of electrophoretic variants of wild soybean glycine soya storage proteins.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53(9):3658-3665.
- Velázquez J. A. y Giraldo P. A. 2005. **Posibilidades competitivas de productos prioritarios de Antioquia frente a los acuerdos de integración y nuevos acuerdos comerciales.**

Informe de Avance. Gobernación de Antioquia. (En línea). Disponible en: http://www.gobant.gov.co/organismos/scompetividad/doc_estudios/analisisdeposibilidadescompetitivasdeproductosprioritarios/frijol.pdf.

Magda Karina Camacho Espinoza

Estudiante de Licenciatura en Biología Departamento Académico de Ciencias Biológicas de la Universidad de Occidente, Guasave, Sinaloa

Luz Isela Peinado Guevara

Estudiante del Programa Regional del Noroeste para el Doctorado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa.

José Ángel López Valenzuela

Profesor Investigador de Tiempo Completo Titular “B” de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Doctor en Ciencia de Plantas (Universidad de Arizona, AZ, Estados Unidos de América). Maestro Ciencia y Tecnología de Alimentos e Ingeniero Bioquímico (Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa).

Ángel Valdez Ortiz

Profesor Investigador de Tiempo Completo de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología de Plantas (Centro de Investigación y de Estudios

Avanzados–Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, Guanajuato). Ingeniero Bioquímico (Universidad Autónoma de Sinaloa). Estancias académicas: Universidad de Wisconsin (Estados Unidos de América). International Center of Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Nueva Delhi, India.

Rafael Atanasio Salinas Pérez

Investigador. Campo Experimental Valle Del Fuerte del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Claudia Graciela Moreno Herrera

Técnico Docente Titular A. Licenciada en Biología (Instituto Tecnológico de los Mochis). Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa.

Sergio Medina Godoy

Profesor Titular “B” del Departamento de Biotecnología Vegetal, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa. Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología de Plantas (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados–Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, Guanajuato). Ingeniero Bioquímico (Universidad Autónoma de Sinaloa). Estancias académicas: Universidad de Purdue (Estados Unidos de América), Universidad de Manitoba (Manitoba, Canadá).