



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Evaluación de las respuestas al déficit hídrico de leguminosas de interés comercial en el Ecuador.

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Bióloga

Presentado por:

Clara Lucía Tello Cabrera

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2018

DEDICATORIA

A todo aquel que se encuentre en un desierto y que tiene la esperanza de encontrar un pozo que se esconde en alguna parte. Recuerda que todas las noches se encienden las estrellas a fin de que puedas encontrar la tuya algún día.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, este nuevo triunfo es en parte gracias a ustedes; a pesar de que en un inicio esta tarea fue interminable y titánica logre culminarla con éxito. Les agradezco a ustedes por mantenerme en sus corazones y plegarias.

A mis ángeles, que me ayudaron en este camino, dándome su apoyo, cobertura y protección; a los cuales siempre les estaré agradecida y ninguna palabra que yo pueda decir podrá cubrir todo lo que hicieron por mí.

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador por permitirme realizar este proyecto en las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular y a sus investigadores la Dra. Nardy Diez y al Ing. Jeffrey Vargas por su tutoría y guía.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Clara Lucía Tello Cabrera* y doy mi consentimiento para que la ESPOOL 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”

Clara Lucía Tello Cabrera

EVALUADORES

.....
Diego Gallardo Polit M.Sc.

PROFESOR DE LA MATERIA

.....
Nardy del Valle Diez Ph.D.

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

El frejol común (*Phaseolus vulgaris*) es la leguminosa con mayor producción en el Ecuador. Posee beneficios biológico, ecológico, social y económico ya que son consideradas potenciales adversarias de la desnutrición y el hambre por su alto contenido de proteínas y a sus altas producciones y consumo en todo el mundo. Sin embargo en los últimos 15 años su producción ha disminuido considerablemente por los estragos del cambio climático, donde el estrés hídrico por sequía es la causante. El objetivo de esta investigación es caracterizar los germinados de variedades de fréjol común (*Phaseolus vulgaris*) mediante el uso de herramientas proteómicas y encontrar proteínas que permitan discriminar las variedades susceptibles de las resistentes al estrés climático por sequía. Se sembraron seis variedades de frejol común en condiciones de estrés hídrico con cinco tratamientos de agua durante 15 días, donde se extrajo las proteínas con el protocolo TCA/Fenol y separadas molecularmente por el método SDS-PAGE donde finalmente cada variedad y su respectivo tratamiento fueron analizados y evaluados con ANOVA, PLS-DA y Heatmap. Donde finalmente se encontró rangos de pesos moleculares en los cuales se encuentran proteínas como faseolinas, dehidrininas, arcelinas, lectinas y proteínas de choque térmico que se presentan comúnmente cuando la planta se encuentra bajo estrés; además, la variedad con mayor resistencia al este estrés fue la INIAP 473 y la susceptible la variedad INIAP 482.

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

ABSTRACT

*The common bean (*Phaseolus vulgaris*) is the legume with the highest production in Ecuador. It has biological, ecological, social and economic benefits that are considered potential adversaries of malnutrition and hunger due to its high protein content and its high production and consumption worldwide. However, in the last 15 years, its production has decrease considerably owing to climate change, being water stress the main cause. The purpose of this research is to characterize the sprouts of common bean varieties (*Phaseolus vulgaris*) by using proteomic tools and find proteins that allow discrimination of susceptible varieties from resistant ones. Six varieties of common bean were planted in water stress conditions with five water treatments for 15 days, proteins were extracted with TCA / Phenol protocol and molecular separations by the SDS-PAGE method where the variety is finally found and its respective treatment analyzed and evaluated with ANOVA, PLS-DA and Heatmap. Finally, ranges of molecular weights are found; proteins like the phasesolinas, dehydratinas, arcelinas, lectins and heat shock proteins appears as the plant is under stress; Moreover, the variety with the greatest resistance in stress was the INIAP 473 and the variety INIAP 482.*

Keywords: *Legumes, Phaseolus vulgaris, water stress, proteins, SDS-PAGE.*

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	6
RESUMEN.....	I
<i>ABSTRACT</i>	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS	V
SIMBOLOGÍA	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
CAPÍTULO 1	9
1. Introducción	9
1.1 Descripción del problema	10
1.2 Justificación del problema.....	10
1.3 Objetivos.....	10
1.3.1 Objetivo General	10
1.3.2 Objetivos Específicos	10
1.4 Marco teórico	11
1.4.1 Generalidades e importancia de las leguminosas.....	11
1.4.2 Influencia de las leguminosas en el mundo.....	11
1.4.3 Leguminosas en el Ecuador.....	12
1.4.1 El fréjol común.....	12
1.4.2 Panorama mundial del fréjol común	14
1.4.3 Panorama en el Ecuador del fréjol común	14
1.4.1 Posibles causas que afectan a las leguminosas	15
1.4.2 Causas que afectan la producción del fréjol común en el Ecuador.....	16
1.4.3 Expresión de proteínas del fréjol común ante el déficit hídrico	18

1.4.4	Estudio de las proteínas en leguminosas.....	19
1.4.5	Variedades de frejol común de la investigación	19
CAPÍTULO 2.....		20
2.	Metodología	20
2.1	Siembra de las variedades	20
2.2	Preparación de las muestras	21
2.3	Extracción de proteína.....	21
2.4	Cuantificación de proteína	22
2.5	SDS-PAGE	23
2.6	Análisis proteico.....	25
2.7	Análisis estadístico	25
CAPÍTULO 3.....		26
3.	Resultados y Análisis	26
3.1	Siembra de las semillas	26
3.2	Extracción y cuantificación de proteínas.....	28
3.3	Análisis proteico.....	29
3.4	Análisis estadístico	30
3.4.1	ANOVA.....	30
3.4.2	PSL-DA	31
3.4.3	Heatmap.....	34
CAPÍTULO 4.....		37
4.	Conclusiones Y Recomendaciones.....	37
4.1	Conclusiones	37
4.2	Recomendaciones	37
BIBLIOGRAFÍA.....		38

ABREVIATURAS

ABA	Ácido Abscísico
ANOVA	Análisis de Varianza
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
ESPAC	Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
FAO	Food and Agriculture Organization
HSP	Heat Shock Proteins
INAMHI	Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología
INEC	Instituto Nacional de Estadística y Censos
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
LEA	Late Embryogenesis Abundant
PCA	Principal Component Analysis
PLS-DA	Partial Least Squares-Discriminant Analysis
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TCA	Acido Tricloroacético

SIMBOLOGÍA

g	gramo
ha	hectárea
kDa	Kilo Dalton
M	Molar
m.s.n.m	metros sobre el nivel del mar
mg	miligramo
ml	mililitro
mm	milímetro
pH	potencial de Hidrógeno
Tm	Tonelada métrica
ug	microgramo
ul	microlitro
V	voltios

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Producción de leguminosas en el Ecuador.	12
Figura 2 Etapa de desarrollo del fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).	13
Figura 3 Producción del fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	14
Figura 4 Pérdida de producción del fréjol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	15
Figura 5 Factores que disminuyen la producción del fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).	17
Figura 6 Protocolo de siembra de semillas de fréjol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	21
Figura 7 Curva Patrón BSA.....	23
Figura 8 Germinados de 5 variedades de fréjol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>).	26
Figura 9 Etapas de desarrollo vegetativo	27
Figura 10 Porcentaje de Germinación.....	28
Figura 11 Gel disociante con proteínas extraídas de <i>Phaseolus vulgaris</i>	30
Figura 12 PSL-DA	31
Figura 13 PLS-DA Análisis por variedad.....	32
Figura 14 PLS-DA Análisis por condición hídrica.....	33
Figura 15 Mapa de calor. Análisis por condición hídrica.	35
Figura 16 Mapa de calor. Análisis de variedades germinadas.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Características agronómicas y morfológicas de variedades de frejol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	19
Tabla 2 Concentracion y Absorbancia de variedades	23
Tabla 3 Reactivos SDS-PAGE	24
Tabla 4 Volúmenes de carga geles SDS-PAGE.....	25
Tabla 5 Concentración proteica para el SDS/PAGE.....	29

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Las leguminosas corresponden a la familia Fabaceae. Según la FAO influyen en la nutrición, salud, cambio climático, biodiversidad y seguridad alimentaria del planeta. Su origen es mesoamericano y globalmente pertenecen al tercer grupo de vegetales con mayor distribución del mundo y con una alta extensión y adaptación en diferentes zonas climáticas. Los distintos eventos climatológicos en el tiempo han permitido que estas especies se diversifiquen y sean de beneficio biológico, ecológico, social y económico ya que son consideradas potenciales adversarias de la desnutrición y el hambre por su alto contenido de proteínas y a sus altas producciones en todo el mundo.

En Ecuador se producen cuatro especies de leguminosas; arveja (*Pisum sativum L.*), haba (*Vicia faba*), lenteja (*Lens culinaris M.*) y frejol común (*Phaseolus vulgaris*); de estas, la que representa mayor importancia debida a sus altas producciones agrícolas es el frejol común. Debido a que están compuestas de un 20 a un 40% de proteína a nivel mundial es la dieta perfecta para combatir la desnutrición y el hambre. El INEC desde el 2002 al 2017 ha reportado datos a través de la ESPAC, indicando que su producción ha disminuido. En los reportes anuales del INEC en 2015, informó que el sector agrícola se vio afectado por el cambio climático, donde la sequía representó el principal enemigo de la producción, donde 57% de cultivos de frejol común se perdió.

Como todo ser vivo, las plantas pierden su homeostasis celular cuando hay estrés en su medio. La sequía genera estrés hídrico por déficit de agua, provocando que ocurran cambios en el interior de sus células, el cual desencadena una cascada bioquímica que tiene como resultado la expresión de proteínas ya sean de defensa, adaptabilidad o susceptibilidad que garantizan la supervivencia de la planta. Para entender la señalización y expresión de los mecanismos que se activan y se sobre expresan en presencia de estrés hídrico, el presente trabajo tiene como objetivo principal caracterizar las proteínas de respuestas a germinados de distintas variedades de frejol común luego de ser sometidos a estrés por déficit hídrico.

1.1 Descripción del problema

La sequía generada por el cambio climático ha provocado la disminución en la producción de frejol común (*Phaseolus vulgaris*) en el Ecuador. Se conoce que estas leguminosas pueden adaptarse a condiciones de estrés mediante cambios bioquímicos y fisiológicos; sin embargo, se ignora cuáles son las variedades que poseen estas características que las vuelven óptimas frente a condiciones climáticas adversas como es la sequía.

1.2 Justificación del problema

La pérdida de producción de frejol común no representa las estrategias y objetivos de desarrollo económico que el Ecuador aspira, ya que son enormes pérdidas económicas para el país. Sumado a la importancia al grano de esta leguminosa por su alto valor nutricional y proteico, y ya que forma parte de la dieta de los ecuatorianos es un atractivo valor culinario, y como estas son capaces de captar nitrógeno al suelo; tornan a esta leguminosa una especie que amerita ser investigada con relevancia y pertinencia total para descubrir su papel dentro de la seguridad alimentaria y como adaptarnos al cambio climático. Este proyecto se realizó para determinar que variedades se adaptan mejor al estrés hídrico por sequía. Al cumplirse los objetivos planteados, se impulsará la zona agrícola especialmente la del frejol común, mejorando su producción y con ello el desempeño de todo el país.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Caracterizar los germinados del fréjol común (*Phaseolus vulgaris*) mediante el uso de herramientas proteómicas.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar las variedades germinadas que poseen resistencia o susceptibilidad al estrés hídrico.
2. Obtener el perfil de proteínas de los germinados, analizando la expresión diferencial entre las distintas variedades y tratamientos.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Generalidades e importancia de las leguminosas

Las leguminosas son plantas que pertenecen a la familia *Fabaceae* o *Leguminosae* se encuentran presentes en el planeta hace 90 millones de años y su dominio puede ser incluso más primitivo que la del maíz. Se extienden a lo largo del planeta en las diferentes zonas climáticas, descartando a los polos y los desiertos. Debido a su amplia distribución geográfica, sus beneficios biológicos, ecológicos, sociales y económicos (FAO, 2016) y la posibilidad de la preservación de semillas en seco, hace de las leguminosas potenciales adversarias contra la desnutrición y el hambre.

1.4.2 Influencia de las leguminosas en el mundo

En el 2016 la Food and Agriculture Organization (FAO) en su publicación “Legumbres: semillas nutritivas para un futuro sostenible” agrupó en cinco las influencias de las leguminosas. Además, declaró al 2016 como “Año de las legumbres”.

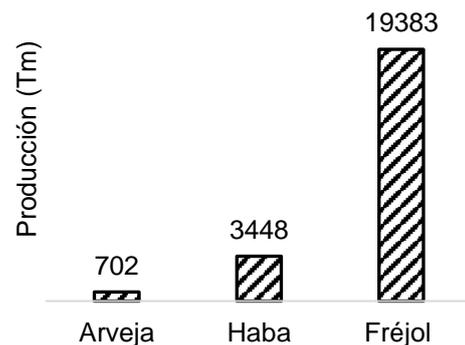
- **Nutrición:** en las últimas décadas la humanidad enfrenta un gran desafío nutricional. Obesidad y hambre, problemas que pueden ser enfrentados con el consumo de leguminosas ya que pueden ser consumidas como una dieta saludable y además alimentar a la población humana que continúa creciendo.
- **Salud:** se ha demostrado que las leguminosas poseen cualidades bioactivas, antioxidantes, proteínas, vitaminas y minerales que complementan la dieta humana en general y además mejoran la salud previniendo enfermedades cardiovasculares, hepáticas y neurológicas.
- **Cambio climático:** varios estudios han concluido que el clima del planeta ha cambiado rápidamente por actividades antropogénicas. Las leguminosas fijan nitrógeno en los suelos donde son cultivados y son mucho más resistentes a cambios climatológicos, por ello se vuelven efectivas para prevenir la erosión del suelo.
- **Biodiversidad:** debido a su capacidad para fijar nitrógeno las leguminosas realizan un impacto positivo y directo, donde los microorganismos *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son estimulados a fertilizar el suelo, mejorando los cultivos.

- **Seguridad alimentaria:** gran parte de la población mundial tiene fuera de su extensión productos cárnicos y lácteos, por lo que las leguminosas pueden participar combatiendo la escasez de alimentos en ciertos países.

1.4.3 Leguminosas en el Ecuador

El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), señala que las leguminosas que produce el país son la: arveja (*Pisum sativum L.*), haba (*Vicia faba*), fréjol (*Phaseolus vulgaris*) y lenteja (*Lens culinaris M.*). Las cuales según la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuarias Continua (ESPAC) tuvieron para el año 2017 una producción por tonelada métrica (Tm) del grano seco de; arveja: 702 Tm, haba: 3 448 Tm y fréjol: 19 383 Tm (Figura 1).

Figura 1 Producción de leguminosas en el Ecuador.



El grano seco con mayor producción (Tm) es el fréjol común (*Phaseolus vulgaris*), convirtiéndola en una importante leguminosa para el Ecuador y el mundo. Con todo el alcance y trascendencia que tiene esta leguminosa, esta investigación dirigirá todos sus esfuerzos a su estudio.

1.4.1 El frejol común

1.4.1.1 Origen

Estudios arqueológicos, morfológicos, bioquímicos y moleculares han demostrado que el frejol común (*Phaseolus vulgaris*) es originario en Mesoamérica, su extensión inicio desde el sur de México y se expandió por toda Sudamérica (Hernández-López, V. M., Vargas-Vázquez, M., Luisa, P., Muruaga-Martínez, J. S., Hernández-Delgado, S., & Mayek-Pérez, N., 2013).

1.4.1.2 Taxonomía

Es una planta leguminosa que fue descrita por primera vez por Linnaeus en 1753 (Gepts, P., Debouck, DG, 1991) y agrupada en la familia Fabaceae (Polanía, J. A., 2011).

1.4.1.3 Etapas de crecimiento

Usualmente el fréjol comprende dos etapas continuas: la vegetativa y la reproductiva como se observa en la figura 2. La velocidad con la que pasa de una etapa se sujeta a la variedad, genotipo de cada variedad de fréjol y variables ambientales (Polanía, J. A., 2011).

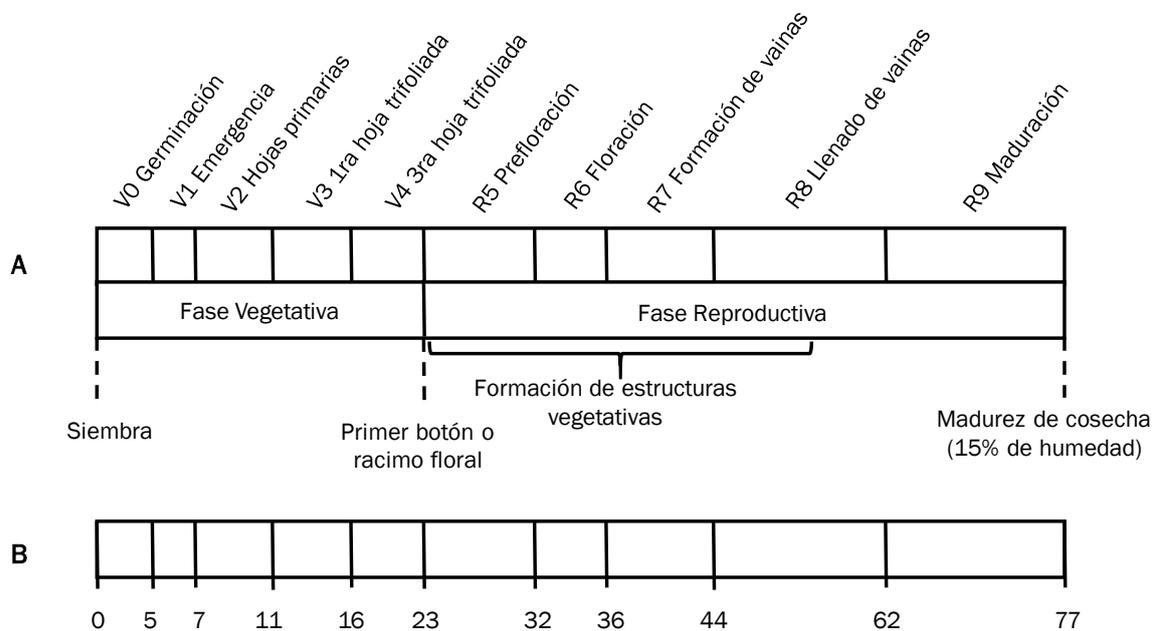


Figura 2 Etapa de desarrollo del fréjol (*Phaseolus vulgaris*).

A. Etapa de desarrollo del fréjol (*Phaseolus vulgaris*). **B.** Días para cada etapa de desarrollo.

Fuente: Calameo, 2018 con modificaciones del autor.

1.4.1.4 Generalidades e importancia del fréjol común

El fréjol es una especie de herbácea. Presenta tallo cilíndrico y angular, hojas trifoliadas, y flores de distintos colores que dependen de la variedad de la especie. Su cultivo y producción es generalmente para el consumo alimenticio. Da vainas con granos los cuales pueden ser preservados o cocinados luego de su cosecha. Son conocidos y consumidos en todo el mundo debido a su rica nutrición, fácil y duradero almacenamiento (Jones, A. L., 1999).

1.4.2 Panorama mundial del fréjol común

Existen más de 40,000 variedades de fréjol común (*Phaseolus vulgaris*). Todas con formas, colores y sabores diferentes. Su consumo y producción es mundial, se extiende en África, Medio Oriente, China, Europa, Estados Unidos, Canadá y Sudamérica. El fréjol está compuesto de un 20 a un 40 % de proteína, por lo que es considerado un grano perfecto para una dieta saludable. El consumo del grano de fréjol es relativamente económico, ayudando a controlar la desnutrición dando esperanza al futuro de países pobres (Mederos, Y., 2013).

1.4.3 Panorama en el Ecuador del fréjol común

En Ecuador el fréjol común (*Phaseolus vulgaris*) se adapta en condiciones adecuadas con rangos de temperatura de 20° a 28°C, valores de precipitación de 400 a 600 mm, a una altitud de 00 a 1600 m.s.n.m. y pH del suelo de 6.5 a 7.5. (Ortega, 2016). Al igual que todas las leguminosas influyen en la nutrición, salud, cambio climático, biodiversidad y seguridad alimentaria.

Desde el año 2002 el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) en su Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) presenta bases de datos donde se mide la superficie plantada y cosechada del grano seco del fréjol.

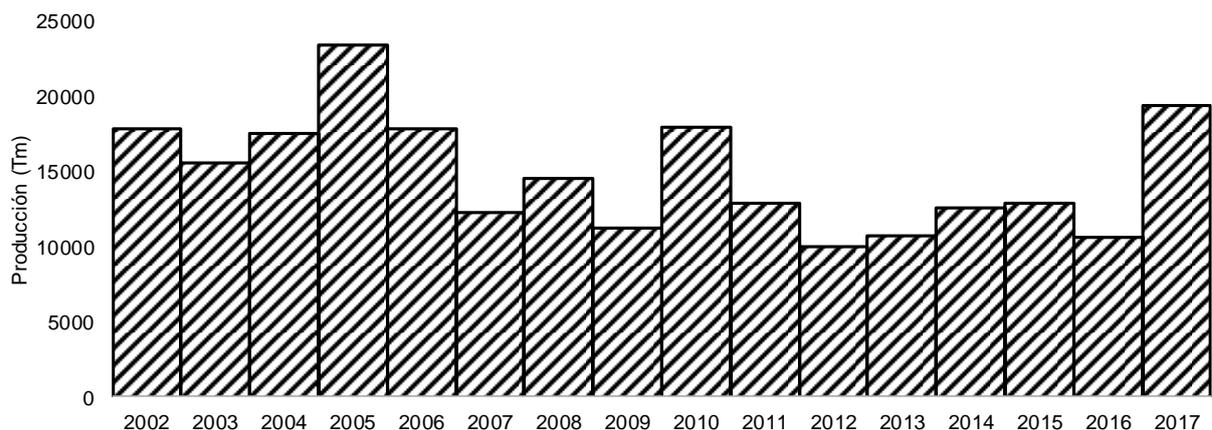


Figura 3 Producción del fréjol (*Phaseolus vulgaris*)

Fuente: elaboración del autor, con datos de la ESPAC del 2017.

La producción de fréjol del 2002 al 2017 no es constante como observamos en figura 3, el proceder nacional de fréjol seco señala que en el año con mayor producción fue en el 2015 con 23.488 Tm y con menor producción se encuentra el año 2012 con 9.990 Tm. Se puede decir que la tendencia de la producción decrece a medida que aumentan los años, para comprender mejor como la producción se ha comportado en la figura 4 se ha agrupado los últimos 16 años (2002 al 2017) en cuatro períodos de cuatro años con sus respectivos valores de desviación estándar (δ), los cuales muestran un descenso en la producción de fréjol.

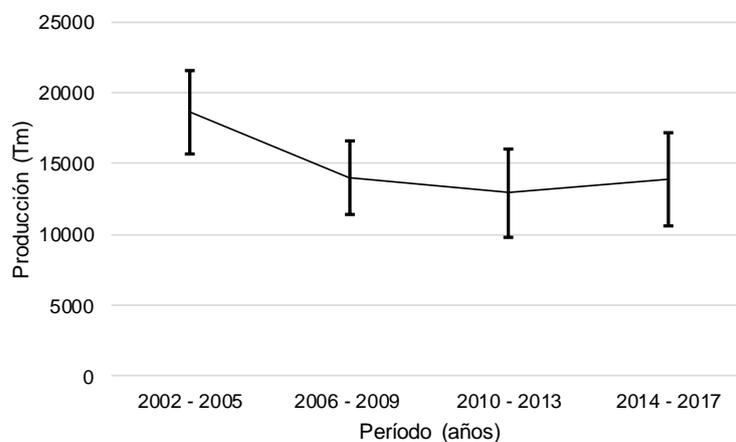


Figura 4 Perdida de producción del frejol común (*Phaseolus vulgaris*).

Primer período (2002 – 2005) y $\delta = 2929.5$, Segundo período (2006 – 2009) y $\delta = 2569.3$, Tercer período (2010 – 2013) y $\delta = 3126.7$, Cuarto período (2014 – 2017) y $\delta = 3284.3$.

Fuente: elaboración del autor, con datos de la ESPAC del 2017.

1.4.1 Posibles causas que afectan a las leguminosas

1.4.1.1 Estrés biótico

Al ser sésiles, las plantas están interactuando constantemente en su entorno, enfrentándose a virus, bacterias, hongos, invertebrados y malezas (Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. 2012). Estudios seguidos y recientes han demostrado que existen varios mecanismos que regulan y que controlan esas interacciones (Zogli, P., & Libault, M. 2017).

1.4.1.2 Estrés abiótico

La biosfera se encuentra constantemente expuesta al estrés abiótico, como la salinidad, sequia, temperatura, tóxicos, estrés oxidativo, etc., los cuales provocan que se desequilibre su estado natural. Las condiciones de estrés alteran y desencadenan una

serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares en las plantas, afectando directamente su crecimiento, producción y pérdida del más del 50% del rendimiento de los cultivos. A pesar de ello las plantas poseen adaptaciones únicas para contrarrestar las condiciones del ambiente con una cascada de reacciones bioquímicas y fisiológicas que involucran a proteínas y genes que se asocian al estrés (Lisar, S. Y., Motafakkerzad, R., Hossain, M. M., & Rahman, I. M., 2012).

1.4.2 Causas que afectan la producción del fréjol común en el Ecuador

La actividad agrícola, se encuentra influenciada por el calentamiento global, convirtiéndola en una preocupación a nivel mundial. Afecta más a los sectores económicos de países subdesarrollados y en vías de desarrollo. De acuerdo al cuarto informe del Panel Intergubernamental en Cambio Climático (IPCC) en 2007, se conoce que el sector agrícola es el que más aporta a las emisiones de dióxido de carbono con un 13.5% antecedido por el sector industrial el cual emite 19.4% de este gas, así como la agricultura ha aportado al calentamiento global, también se ha visto afectada.

El Ecuador agrícola ha obtenido pérdidas debido a la frecuencia de efectos que están asociados al cambio climático y que han aumentado en los últimos años, que perjudican a la producción de cultivos (crecimiento y reproducción) debido a los cambios de temperatura y pluviosidad inestables que al mismo tiempo provocan que surjan plagas, decesos y alteraciones de las lluvias respectivamente (Jiménez, S., Castro, L., Yépez, J., & Wittmer, C. 2012).

En 2015 el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) presentó datos del sector agrícola y la influencia del clima sobre los cultivos de interés, económicos y nutricionales. Se han agrupado en seis las causas de la pérdida de superficie de hectáreas cultivadas; y son: sequía, helada, plagas, enfermedades, inundaciones y otras. De todas las hectáreas de terreno que corresponden al cultivo de especies arveja, cebada, fréjol, haba, maíz, papa, quinua, soya, trigo) que se han perdido, la mayor parte de pérdida (has.) corresponden a estragos ocasionados por la sequía.

La sequía provocó en el 2015 más del 40% de pérdidas de en todos los cultivos. Para el cultivo del fréjol (*Phaseolus vulgaris*) existe una pérdida de 4 991 ha (figura 5) que representa un 64,57% de producción fallida.

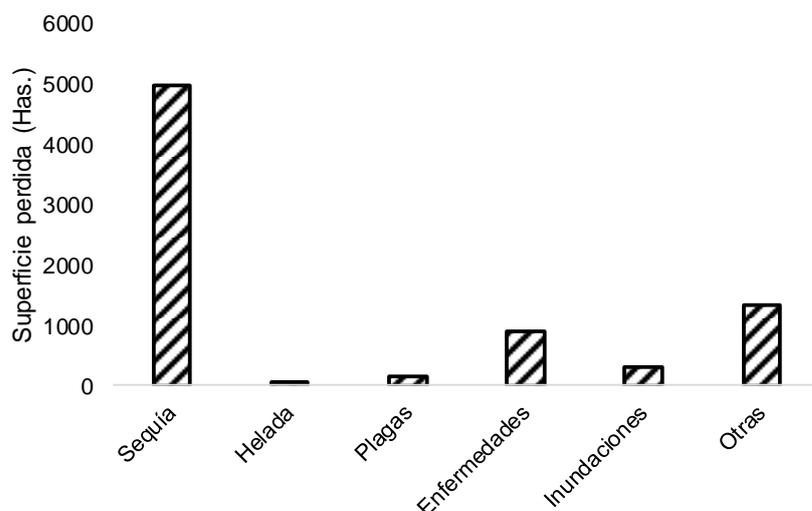


Figura 5 Factores que disminuyen la producción del fréjol (*Phaseolus vulgaris*).

Fuente: elaboración del autor, con datos del INEC en 2015.

En reportes del 2016 de Estudios e Investigaciones Meteorológicas (INAMHI) detallan que las condiciones para los cultivos se están viendo afectadas negativamente. Aunque las precipitaciones para ese año se mantuvieron heterogéneas, aun existían lapsos de intensas precipitaciones y sequía.

1.4.2.1.1 Estrés hídrico

Es causado principalmente por sequías, inundaciones o por la alta salinidad del suelo (Lisar, S. Y., Motafakkerazad, R., Hossain, M. M., & Rahman, I. M., 2012).

1.4.2.1.2 Déficit hídrico

Como estrés abiótico, la sequía, afecta a las plantas reduciendo su potencial hídrico y turgencia, lo que desencadena y eleva concentraciones de solutos en el citoplasma celular y matriz extracelular, inhibiendo su crecimiento y reproducción. Bajo sequía prolongada acumulan en grandes cantidades ácido abscísico (ABA) que causan el marchitamiento. Este tipo de estrés no solo afecta las relaciones hídricas, afecta la turgencia y cierra las estomas limitando el intercambio gaseoso, reduce la transpiración y detiene la fotosíntesis. Cuando existe una alteración de la homeostasis dentro de la célula se segregan proteínas y mRNAs que están asociadas al estrés hídrico (Lisar, S. Y., Motafakkerazad, R., Hossain, M. M., & Rahman, I. M., 2012).

1.4.3 Expresión de proteínas del fréjol común ante el déficit hídrico

Las condiciones de sequía provocan cambios cuantitativos y cualitativos en las proteínas del fréjol (*Phaseolus vulgaris*). El estrés hídrico altera la expresión de los genes y por ende la síntesis de proteínas. Las proteínas de embriogénesis tardía (LEA) son las que principalmente se sintetizan en respuesta a la sequía y que responden a ABA, dehidrinas, proteasas, proteínas de choque térmico (HSPs), entre otras (Lisar, S. Y., Motafakkerzad, R., Hossain, M. M., & Rahman, I. M., 2012).

Las proteínas de embriogénesis tardía (LEA), una vez que inicia la pérdida de agua de la planta estas se acumulan y existe una sobreexpresión. Sirven como promotoras de otras proteínas que pueden así mismo activarse y ayudar a mantener la planta con vida a pesar de la carencia de agua (Olvera-Carrillo, Y., Luis Reyes, J., & Covarrubias, A. A., 2011). Existen otras proteínas que se acumulan en condiciones de déficit hídrico, las hidrofílicas, que forman parte de las LEAs se acumulan en las semillas secas y así mismo se hay una sobreexpresión ante la falta de agua ocasionada por la sequía (Cuevas-Velázquez, C. L., & Covarrubias-Robles, A. A. 2011). Proteínas de choque térmico HSPs que tienen un rol principal en mantener la homeostasis y las condiciones óptimas para la planta pueda mantener un desarrollo óptimo, además se encarga de muchas funciones en las células vegetales (Park, C. J., & Seo, Y. S., 2015). Existen varias investigaciones que alegan que las dehidrinas o proteínas de deshidratación, forma parte de las proteínas de embriogénesis tardía LEA, aunque no se conoce cuáles son los efectos fisiológicos de la planta se sabe que su sobreexpresión es un indicador de estrés, aún hay mucho de esta proteína que debe explorarse (Graether, S. P., & Boddington, K. F., 2014).

1.4.3.1 Proteína común del fréjol común

La faseolina es la proteína de la cual se encuentra mayormente conformada la semilla del fréjol común (*Phaseolus vulgaris*). Su rol es la organización del pool de genes, gracias a esta proteína se ha podido como marcador evolutivo de la especie y conocer el origen central de la misma (Rodiño Míguez, A. P., 2001).

1.4.4 Estudio de las proteínas en leguminosas

En plantas, las moléculas más estudiadas son las proteínas; su estructura, sus propiedades químicas y su función para el organismo (Casado-Vela, J., 2004). Para conocer cuáles son las vías metabólicas que han desarrollado las plantas la proteómica ha sido la herramienta ómica que ha permitido el estudio cualitativo y cuantitativo de las proteínas que están involucrados en ese desarrollo.

1.4.5 Variedades de frejol común de la investigación

Tabla 1 Características agronómicas y morfológicas de variedades de frejol común (*Phaseolus vulgaris*)

Características Agronómicas y Morfológicas						
VARIEDAD	Forma del grano	Tamaño de grano	Color de grano seco	Forma del grano	Peso de 100 granos	Rendimiento promedio:
482	Arbustivo	Pequeño	Negro	Ovalado	18 g	1894 kg/ha
SUG 8	Arbustivo	Pequeño	Redondeada	Arriñonado	17.45 g	2276 kg/ha
FOT61	Arbustivo	Pequeño	Cilíndrica reniforme	Arriñonado	24.66 g	1510 kg/ha
ICTAJU	Arbustivo	Pequeño	Arriñonada	Arriñonado	13.53 g	597 kg/ha
473	Arbustivo	Grande	Rojo / Rosado	Arriñonado	86 a 104 g	2224 kg/ha

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

Esta investigación se realizó en los laboratorios de biología molecular del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), ubicada en el campus Gustavo Galindo de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) bajo el proyecto “Caracterización del proteoma de frejol (*Phaseolus vulgaris*) de la costa ecuatoriana”.

2.1 Siembra de las variedades

Se emplearon cinco variedades mejoradas por cruce y selección las cuales fueron proporcionadas por el INIAP, las semillas presentan resistencia total o parcial de enfermedades por patógenos, además de una alta adaptabilidad y rendimiento. Sus nombres corresponden a ICTAJU, INIAP 482, INIAP 474, INIAP 473, FOT 61 y SUG 8. El diseño experimental fue en orden aleatorio, con cinco tratamientos de agua: 80% control de riego negativo, 70% control de riego, 60% estrés moderado, 40% estrés severo y 20% control de riego negativo. Las unidades experimentales de siembra consistieron de tachos plásticos (figura 7. A) de 10 cm de ancho por 20 cm de largo (200 centímetros cuadrados), las cuales se llenaron con bentonita, que es una arcilla con baja retención de humedad (figura 7. B) asegurando las condiciones de estrés por déficit hídrico, además de papel filtro encima del sustrato (figura 7. C) el cual ayudó a retirar el producto germinado de forma eficiente. Se desinfectaron las semillas de cada variedad con Tween 20 al 0.1% por 30 minutos, seguido se procedió a sembrar 10 semillas por cada unidad experimental (figura 7. D) y por cada una de las variedades de *Phaseolus vulgaris*. Se suministro el agua en los distintos tratamientos (figura 7. E). Cada unidad de muestreo se tapó para evitar que pierda la humedad suministrada inicialmente y fueron almacenadas en el fitotrón Thermo Fisher, en condiciones de oscuridad por 8 días, y con fotoperiodo de 14 h durante los próximos 7 días y 22°C (temperatura óptima de crecimiento) durante los de 15 días de siembra.

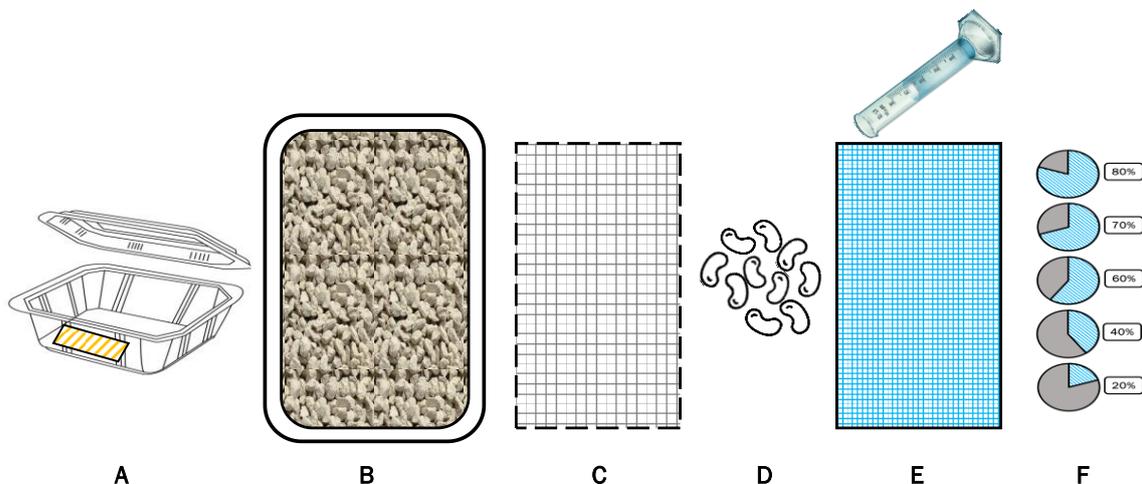


Figura 6 Protocolo de siembra de semillas de frejol común (*Phaseolus vulgaris*)

2.2 Preparación de las muestras

Culminado los 15 días se procedió a retirar el producto vegetal de cada una de las unidades de muestreo y se las enjuago con agua potable, inmediatamente y con condiciones de frio para preservar la muestra se procedió a retirar los cotiledones de cada plántula y se procedió a colocar cada una de las muestras en molinos de bolas de acero inoxidable Retsh MM 400 y se añadió la solución fijadora TCA 10% Acetona (el volumen añadido dependió de cada una de las muestras ya que variaban en tamaño) de tal forma de quedar cubierto el material vegetal y garantizando la fijación de la plántula, seguido se trituraron las muestras con una frecuencia de 30 durante 20 segundos, luego el contenido fue almacenado en tubos eppendorf de 2 ml y conservados en -20°C .

2.3 Extracción de proteína

Se emplearon aproximadamente 100 mg del producto vegetal de cada una de las variedades, añadiendo 1 ml de la solución TCA 10% Acetona, donde por 10 segundos se ejecutó vórtex e inversiones seguidas para asegurarse que la solución y la muestra se homogenice, luego se centrifugó a 4°C a 12000 rpm durante 10 minutos; se deshecha el sobrenadante y mantenemos el precipitado que se forma y al cual se le añadió 1 ml de solución Acetato Amónico 0.1 M en Metanol 80% rompiendo el producto centrifugado realizando vórtex e inversiones seguidas y se centrifugó nuevamente con las condiciones pasadas y eliminando el sobrenadante se colocó una solución de Acetona 80%

despedazando el pellet y realizando vórtex y centrifugando en las condiciones pasadas por 10 minutos (este paso se puede repetir hasta conseguir que el producto de la centrifugación quede blanco, ya que hay variedades como la INIAP 482 que posee muchos pigmentos) y se dejó secar en temperatura ambiente durante 3 horas. Seguido de esto llevamos los tubos con el pellet seco a la cámara de flujo donde se añadió 600 ul de la solución SDS Buffer + 75 ul de fenol pH8 Sigma, mezclando las soluciones de manera uniforme, se realizó vórtex y se centrifugó en 4°C a 12000 rpm por 10 minutos. Se recuperó la parte fenólica de cada tubo para cada variedad y se la colocó en nuevos tubos eppendorf de 1.5 ml a los cuales se les añadió 1 ml de Buffer de Precipitación y se almacenó durante 4 horas en -80°C (o puede almacenarse en -20°C toda la noche). Posteriormente se centrifugó en condiciones pasadas y se eliminó el sobrenadante recuperando el pellet y se dejándolo secar a temperatura ambiente por 2 horas, pasado esto se añadió la solución Buffer de Solubilidad (Urea 7 M, Thiourea 2M, CHAPS 4%, Triton 2%, DTT 100 mM) hasta romper totalmente el pellet donde se colocó 125 ul para la variedad INIAP 473, 75 ul FOT 61 y 50 ul INIAP 482, ICTAJU y SUG 8 y finalmente se almacena cada uno de los tubos en -20°C.

2.4 Cuantificación de proteína

El método empleado fue Bradford (1976) donde se colocó en una placa multipocillos 10 ul de cada muestra solubilizada 50 veces (40 ul de agua destilada + 1 ul de muestra) y 200 ul del reactivo de Bradford dejando incubar durante 5 minutos en temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia de los 15 pocillos (3 tratamientos x 5 variedades) en el espectrómetro BioTek con una lectura de 595 nm. Los valores se visualizaron en el programa Gen5 1.07 y luego fueron interpolados a una curva patrón (Figura 7) montada a partir de una proteína estándar BSA (Albúmina Sérica Bovina) empleando el despeje de la ecuación 1:

$$y = mx + b$$

$$x = \frac{y - b}{a}$$

Donde:

y: Absorbancia

b: Valor mínimo

x: Concentración

m: Pendiente

a: Valor máximo

Figura 7 Curva Patrón BSA

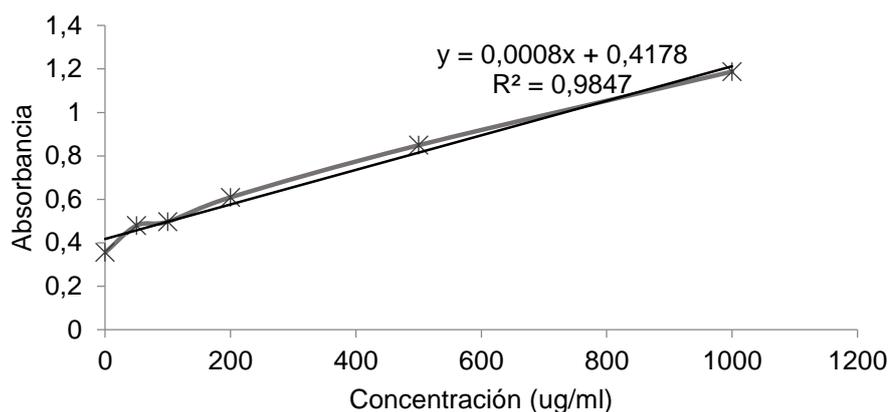


Tabla 2 Concentración y Absorbancia de variedades

Tratamiento	Variación	Concentración (x)	Concentración (x) * 50 ug/ml
70% (Control de germinación)	ICTAJU	117,75	5887,5
	INIAP 482	345,25	17262,5
	INIAP 473	276,5	13825
	FOT 61	430,25	21512,5
	SUG 8	121,5	6075
60% (Estrés moderado)	ICTAJU	285,25	14262,5
	INIAP 482	425,25	21262,5
	INIAP 473	249	12450
	FOT 61	200,25	10012,5
	SUG 8	215,25	10762,5
40% (Estrés crítico)	ICTAJU	120,25	6012,5
	INIAP 482	275,3	13762,5
	INIAP 473	280,25	14012,5
	FOT 61	281,5	14075
	SUG 8	339	16950

2.5 SDS-PAGE

Primero se realizaron geles discontinuos de poliacrilamida. La parte inferior del gel consiste en un entramado de 12% de porosidad con 8.8 pH, es denominado gel separador seguido se encuentra la segunda parte que es el gel concentrador de 4% de porosidad de 6.8 pH.

Tabla 3 Reactivos SDS-PAGE

Reactivos	Gel concentrador 4% (ul)	Gel separador 12% (ul)
Agua	1558	2398
40% A/bis	200	1500
1.875 M Tris pH 8.8	-----	1000
1.875 M Tris pH 6.8	200	-----
10% SDS	20	50
10% AP	50	50
TEMED	5	5
Vol. Final	2 ml	5 ml

Las muestras son colocadas en pocillos de un volumen de 15 ul, para ello se divide en un volumen que corresponda a la concentración ug/ml de cada variedad y su respectivo tratamiento como se observa en la tabla 4. Se colocó en nuevos tubos la cantidad (ul) de cada una de las muestras en nuevos tubos eppendorf de 0.2 ml y dentro de la cámara de flujo se le añadió a cada uno 1 ul de Buffer de Muestra los cuales se calentaron a baño maría durante 5 minutos a 75°C. Se conservaron los tubos en 4°C (pueden quedar a temperatura ambiente ya que las proteínas han sido desnaturalizadas). Seguido se procedió a colocar lo geles en los tanques de electroforesis los cuales fueron llenados con Buffer de Corrida 1x, con el gel adentro se retiró el peine y se situó entre los primeros pocillos 7 ul del marcador de peso molecular de proteínas de 200 kDa (antes de colocar se realizó un spin de 10 segundos en la mini centrífuga Eppendorf para asegurar la homogeneidad) y así mismo se colocó cada una de las muestras desnaturalizadas en los pocillos y por triplicado de cada variedad y tratamiento. Se cerró el sistema tapando el tanque se procedió a programar el equipo de electroforesis a 100 V (la primera hora y quince minutos) y 80 V (los últimos 60 minutos). Culminada la electroforesis se retiraron los y se los asentó sobre cubetas separadas donde fueron cubierto con azul de Coomassie para que se tiñan durante 3 horas, finalmente se retira el tinte y de descolora con ácido acético al 100% toda la noche.

Tabla 4 Volúmenes de carga geles SDS-PAGE

Condición	Variedad	Con. (x) * 50 ug/ul	SDS PAGE ul
70% (Control)	ICTAJU	5,9	2,5
	INIAP 482	17,3	0,9
	INIAP 473	13,8	1,1
	FOT 61	21,5	0,7
	SUG 8	6,1	2,5
60% (Estrés moderado)	ICTAJU	14,3	1,1
	INIAP 482	21,3	0,7
	INIAP 473	12,5	1,2
	FOT 61	10,0	1,5
	SUG 8	10,8	1,4
40% (Estrés crítico)	ICTAJU	6,0	2,5
	INIAP 482	13,8	1,1
	INIAP 473	14,0	1,1
	FOT 61	14,1	1,1
	SUG 8	17,0	0,9

2.6 Análisis proteico

El análisis es comparativo y para visualizar los patrones o bandas que causaron la electroforesis se procedió a tomar fotografías de los geles empleando el equipo Perkin Elmer modelo ProXCISION y para sus análisis el programa Image lab 6.0. el cual permitió esclarecer los patrones y cuantificar la cantidad de proteína presente empleando como molde el marcador de peso molecular.

2.7 Análisis estadístico

Los patrones obtenidos y valores de cuantificación del marcador de peso molecular y absorbancia de cada variedad y su tratamiento se ordenaron, normalizaron y agruparon en tres grupos análisis diferentes 1) Comparación de todas las variedades 2) Comparación de cada una de las variedades individualmente y 3) Comparación de los tratamientos de estrés por déficit hídrico respecto a cada variedad. Cada uno de estos grupos de sometieron al Análisis de Varianza (ANOVA), y Análisis Discriminante Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA) los cuales fueron obtenidos del programa online MetaboAnlyst.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Siembra de las semillas

Después de los 15 días de la aplicación de los 5 tratamientos: 80% control de riego negativo, 70% control de riego, 60% estrés hídrico moderado, 40% estrés hídrico severo y 20% control de riego negativo. No se obtuvo el producto germinado de los tratamientos negativos como era de esperarse, en el tratamiento de 80% las semillas se pudrieron y se llenaron de hongos mientras que para el tratamiento de 20% ninguna de las semillas germinó; por ende, para este estudio y con las variedades estudiadas mencionadas anteriormente se manifiesta que en una concentración $\leq 20\%$ y $\geq 80\%$ de agua en el sustrato no habrá germinación.



Figura 8 Germinados de 5 variedades de frejol común (*Phaseolus vulgaris*).

Fuente: elaboración del autor.

Fueron 6 las variedades de frejol común (*Phaseolus vulgaris*) cultivadas: FOT 61, ICTAJU, INIAP 473, INIAP 474, INIAP 482 Y SUG 8; sin embargo, no se obtuvo resultados para las semillas de la variedad INIAP 474 ya que para cada tratamiento las

semillas se contaminaron de hongos y no germinaron. Por ello, solo es posible presentar los resultados de cinco variedades para los tres tratamientos de 70% control de riego, 60% estrés hídrico moderado y 40% estrés hídrico severo (Figura 8). Del día 0 al día 5 de la siembra se pudo evidenciar que las semillas de cada una de las cinco variedades se hincharon facilitando la etapa de germinación V0 (figura 9 A) y dando paso a la etapa de emergencia V1 (figura 9 B) que es donde el cotiledón se separa del suelo hasta el día 11 donde inicia el apareamiento de las hojas primarias V2 y hasta el día 15 en donde aparecen las primeras hojas trifoliadas V3 (figura 9 C).

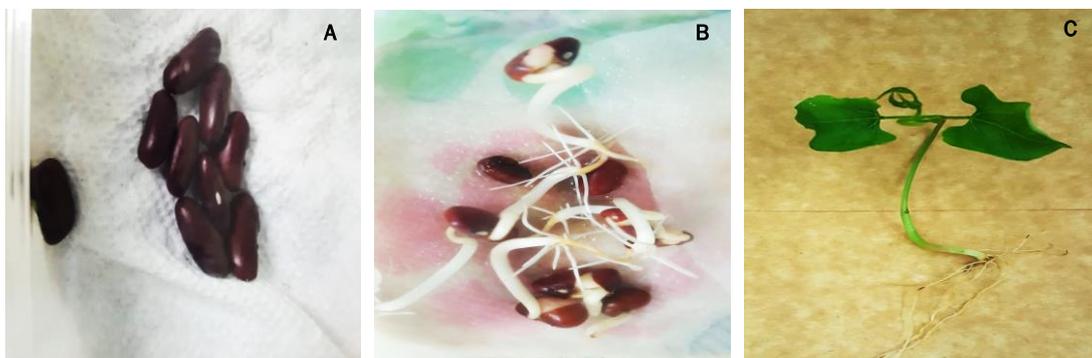


Figura 9 Etapas de desarrollo vegetativo
A. Etapa V0. B. Etapa V1. C. Etapa V3
Fuente: elaboración del autor.

Inicialmente fueron 10 las semillas que se aplicaron en las unidades experimentales de siembra por variedad y por tratamiento, pero pasado los 15 días no todas las semillas germinaron, por ello se calculó el porcentaje de germinación entre las cinco variedades germinadas y los tres tratamientos finales. La figura 10 A muestra el porcentaje de germinación de cada una de las variedades, donde se observa que la variedad con mayores semillas germinadas fue la INIAP 473 con un 67%, seguido de la SUG 8, ICTAJU, FOT 61 e INIAP 482 con 57%, 55%, 50% y 48% respectivamente. Según los resultados de los tres tratamientos de 70% control de riego, 60% estrés hídrico moderado y 40% estrés hídrico severo en la figura 10 B se observa que las variedades presentaron un mayor porcentaje de germinación en el tratamiento de 60% donde la variedad INIAP 473 obtuvo el más alto valor de germinación entre las variedades del tratamiento de estrés moderado y entre todos los tratamientos con un porcentaje de germinación de 85%.

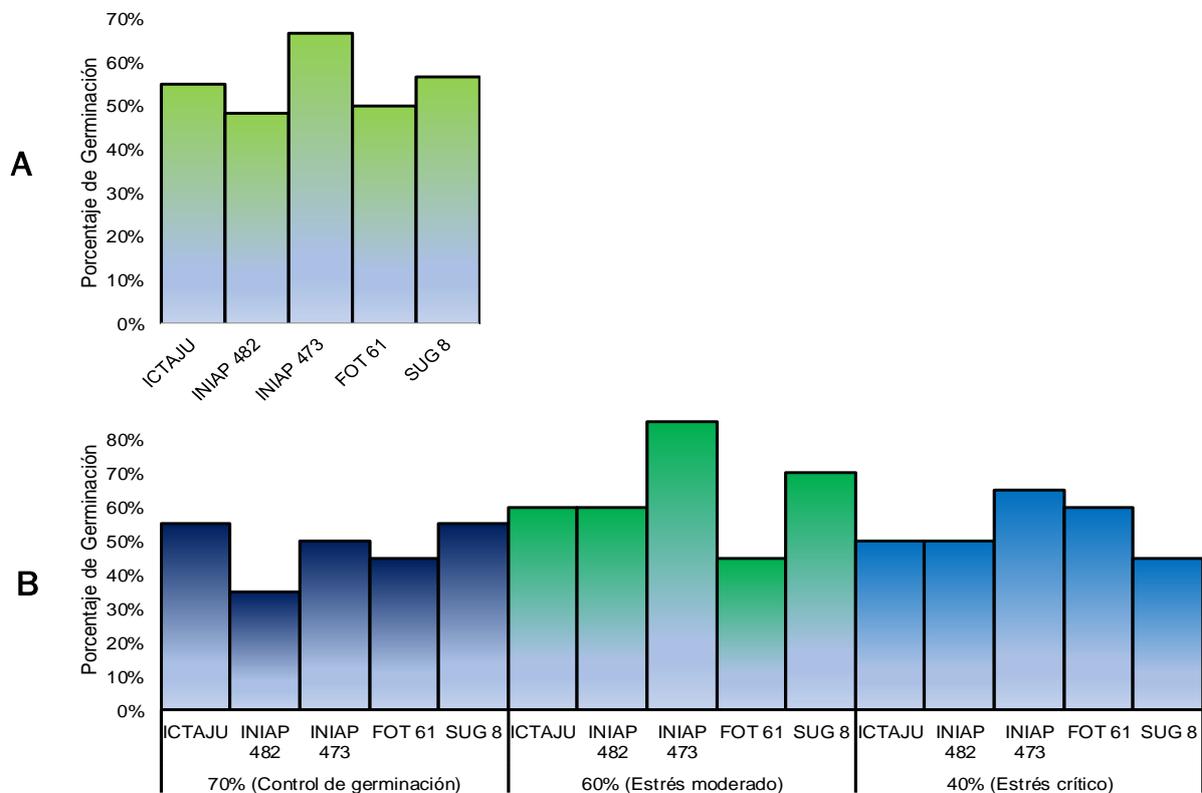


Figura 10 Porcentaje de Germinación.
A. Para cada variedad. **B.** Por tratamiento.
Fuente: elaboración del autor.

3.2 Extracción y cuantificación de proteínas

A través de la extracción de proteínas TCA/Fenol se obtuvo material proteico de cinco variedades FOT 61, ICTAJU, INIAP 473, INIAP 482 y SUG 8 para tres tratamientos 70% control de riego, 60% estrés hídrico moderado y 40% estrés hídrico severo es decir de 15 muestras. Las cuales para la cuantificación fueron diluidas cincuenta veces y ajustadas e interpoladas a la curva patrón de Albúmina Sérica Bovina (BSA) que posee una bondad de ajuste R^2 : de 98% de confianza. Obtenida la concentración (x) se calculó el valor de las proteínas en ug/ml multiplicando la concentración inicial calculada por 50, así mismo la concentración ug/ul fue encontrada de la división de los valores de ug/ml para 1000. Conociendo previamente que 15 ul es el volumen de los pocillos de los peines del gel se tomó en cuenta este valor para hacer el cálculo de la cantidad de proteína que se deberá usar en la SDS/PAGE, valor que finalmente fue calculado de la multiplicación de 15 para los ug/ul de cada muestra.

Tabla 5 Concentración proteica para el SDS/PAGE
Fuente: elaboración del autor.

Tratamiento	Variiedad	Concentración (x)	Concentración (x) * 50 ug/ml	Concentración (x) * 50 ug/ul	SDS/PAGE
70% (Control de germinación)	ICTAJU	117,75	5887,5	5,9	2,5
	INIAP 482	345,25	17262,5	17,3	0,9
	INIAP 473	276,5	13825	13,8	1,1
	FOT 61	430,25	21512,5	21,5	0,7
	SUG 8	121,5	6075	6,1	2,5
60% (Estrés moderado)	ICTAJU	285,25	14262,5	14,3	1,1
	INIAP 482	425,25	21262,5	21,3	0,7
	INIAP 473	249	12450	12,5	1,2
	FOT 61	200,25	10012,5	10,0	1,5
	SUG 8	215,25	10762,5	10,8	1,4
40% (Estrés crítico)	ICTAJU	120,25	6012,5	6,0	2,5
	INIAP 482	275,3	13762,5	13,8	1,1
	INIAP 473	280,25	14012,5	14,0	1,1
	FOT 61	281,5	14075	14,1	1,1
	SUG 8	339	16950	17,0	0,9

3.3 Análisis proteico

Las proteínas aisladas de las cinco variedades FOT 61, ICTAJU, INIAP 473, INIAP 482 y SUG 8 y sus respectivos tratamientos 70% control de riego, 60% estrés hídrico moderado y 40% estrés hídrico severo fueron separadas electroforéticamente con la técnica SDS/PAGE (figura 11) en cuatro geles con tres replicas por variedad y tratamiento respectivamente empleando un marcador molecular (MM) de 200 kDa donde se visualizaron finalmente la separación de cada proteína según su peso molecular, los geles se analizaron en el programa Image lab 6.0 donde se pudo cuantificar las proteínas presentes además de extrapolar su respectivo peso molecular con el estándar del protocolo del marcador molecular **LO315** el cual posee 8 bandas (200, 97, 66, 29, 17 y 14) kDa.

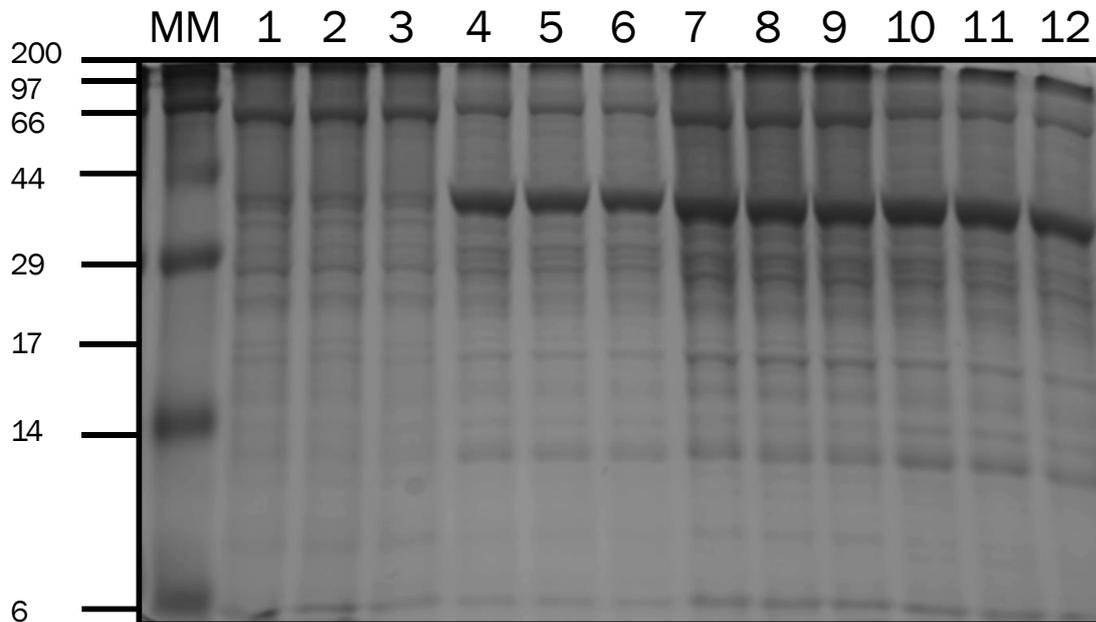


Figura 11 Gel disociante con proteínas extraídas de *Phaseolus vulgaris*.
Fuente: elaboración del autor.

3.4 Análisis estadístico

Se aplicó un análisis estadístico univariado (ANOVA) y para interpretar mejor las agrupaciones entre variedades y tratamientos, un análisis estadísticos multivariados (PLS-DA) que, aunque no deberían aplicar en este análisis debido a que los datos obtenidos son univariados, se lo aplicó debido a la fácil interacción e interpretación de los resultados obtenidos y finalmente para comprender mejor la estadística y el comportamiento de los datos se realizaron mapas de calor (HeatMaps). Todos estos análisis fueron realizados en el programa libre MetaboAnalyst, donde los datos fueron ordenados, normalizados y agrupados en los siguientes grupos: 1) Comparación de todas las variedades 2) Comparación de cada una variedad individualmente y 3) Comparación de los tratamientos de estrés por déficit hídrico respecto a las variedades.

3.4.1 ANOVA

Este método univariado es común para el análisis de datos exploratorios. Los resultados del ANOVA indican la comparación global y si es significativa o no, para ello se realizó el análisis post hoc de Fisher (LSD de Fisher) para identificar las diferencias menos significativas entre las variedades. Los resultados de ANOVA para los análisis de las

proteínas de las variedades, entre variedades y entre tratamientos, con su valor de significancia $p: 0,05$, donde los valores mayores a $0,05$ son estadísticamente confiables y poseen significancia.

3.4.2 PSL-DA

El Análisis Discriminante Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA) a través de técnicas de regresión multivariable extrae mediante una combinación lineal las variables originales para darle mayor pertenencia a los datos, a de más de que me permitió visualizar los datos agrupados mejor me da una predicción de cómo deberían de agruparse, mejorando la interpretación como se observa en la figura 15, que corresponde al PLS-DA de todas las variedades.

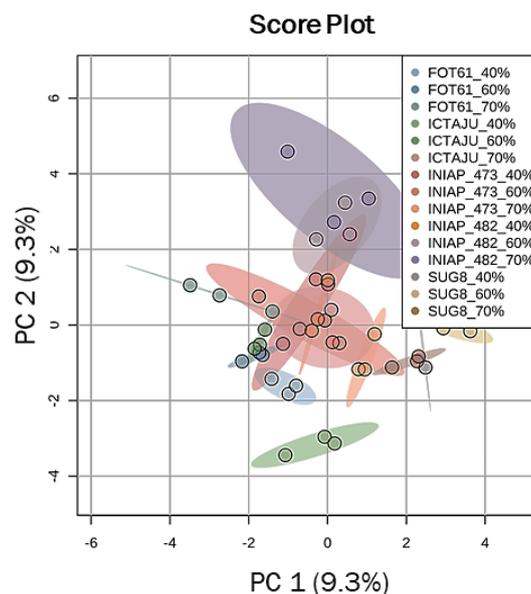


Figura 12 PSL-DA
Fuente: elaboración del autor.

Para el análisis PLS-DA de cada variedad se puede observar en la figura 16 que cada variedad y su tratamiento es totalmente diferente a la otra. Este análisis además agrupa tres componentes y señala con un asterisco rojo la modelo que se ajusta mejor dentro del componente respectivo, si el asterisco rojo se encuentra entre los valores ≤ 0.5 de performance indican que no existe confianza en el modelo empleado, y, valores ≥ 0.5 de performance indican que existe confianza en el modelo y que puede ser ejecutado en toda la población; es decir, en cada variedad (figura 17).

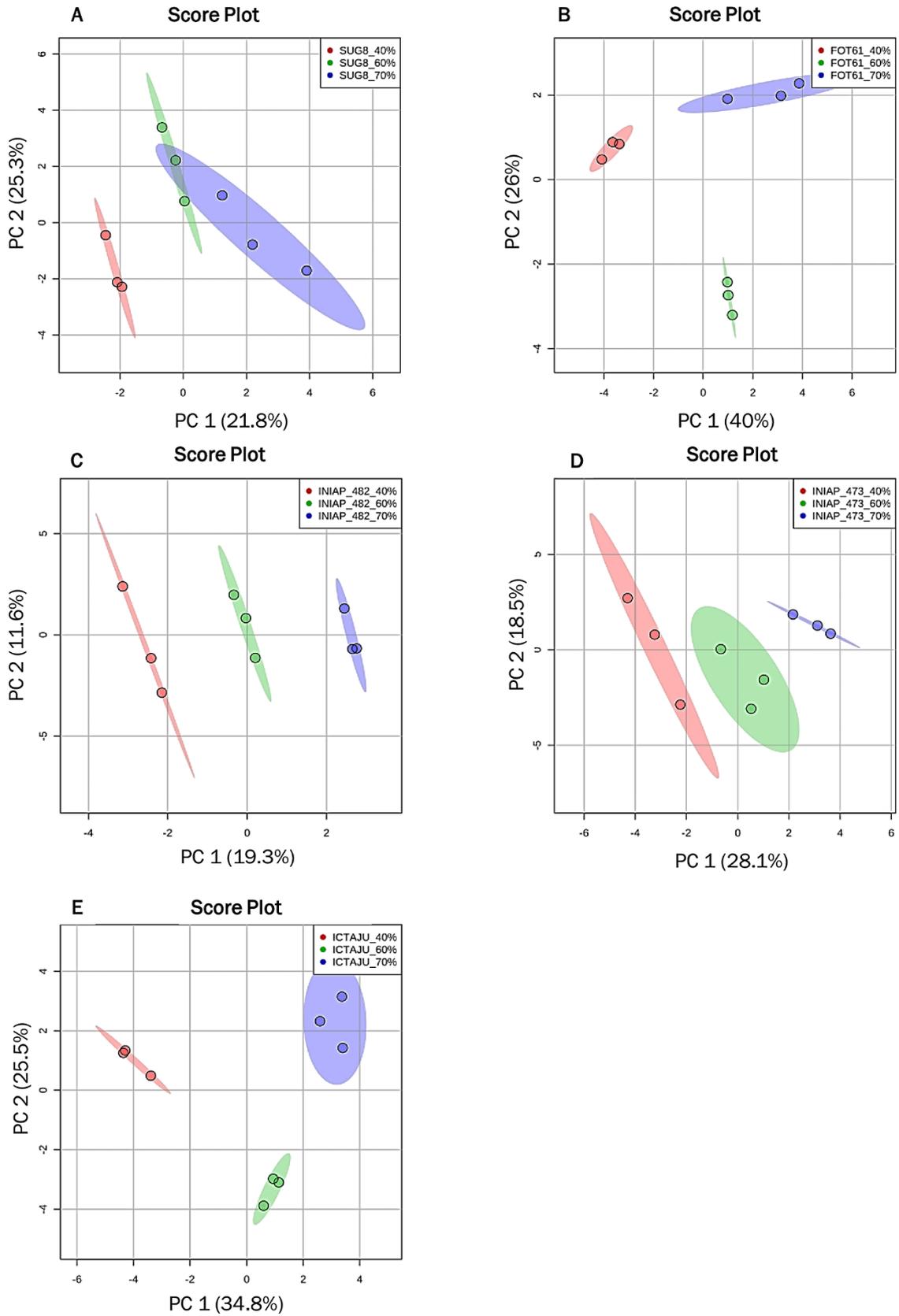


Figura 13 PLS-DA Análisis por variedad.
Fuente: elaboración del autor.

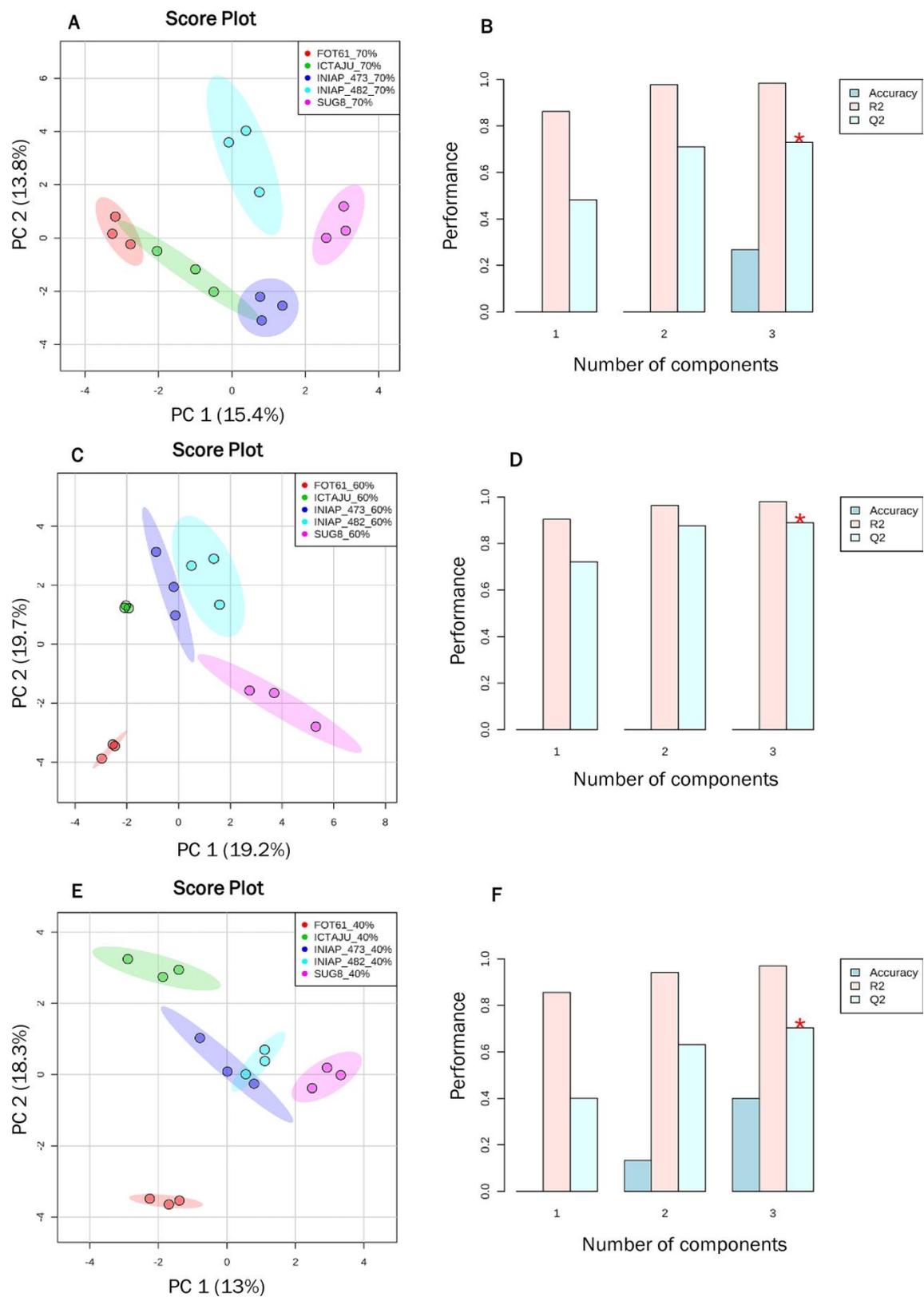


Figura 14 PLS-DA Análisis por condición hídrica.
Fuente: elaboración del autor.

3.4.3 Heatmap

Este análisis se encargó de aglomerar los distintos grupos y de forma algorítmica los combina hasta que todas pertenezcan a un mismo grupo. Se deben tener en cuenta dos parámetros al realizar la agrupación jerárquica. La primera es la medida de similitud: la distancia euclidiana, la correlación de Pearson, la correlación de rango de Spearman. El otro parámetro son los algoritmos de agrupamiento, que incluyen el enlace promedio (el agrupamiento usa los centroides de las observaciones), el enlace completo (el agrupamiento usa el par de observaciones más lejano entre los dos grupos), el enlace único (el agrupamiento usa el par de observaciones más cercano) y el enlace de Ward (agrupación para minimizar la suma de cuadrados de cualquiera de los dos grupos).

Se realizaron dos figuras las cuales contienen: figura 19 presenta el conjunto de todas proteínas de todas las variedades en el cual se observa que existen grupo de proteínas que son únicas o que se comparten únicamente en esas variedades y que las agrupaciones de esas proteínas se son diferentes entre tratamientos. En la figura 20 por contrario se aglomeraron los datos proteicos de los tratamientos 70% control de riego, 60% estrés moderado y 40% estrés severo además de un mapa de calor de las proteínas obtenidas de semillas secas de cada una de las variedades de este estudio (figura 20 A), que no forman parte de los objetivos; sin embargo, es interesante observar como las proteínas son totalmente diferente con respecto a las semillas germinadas.

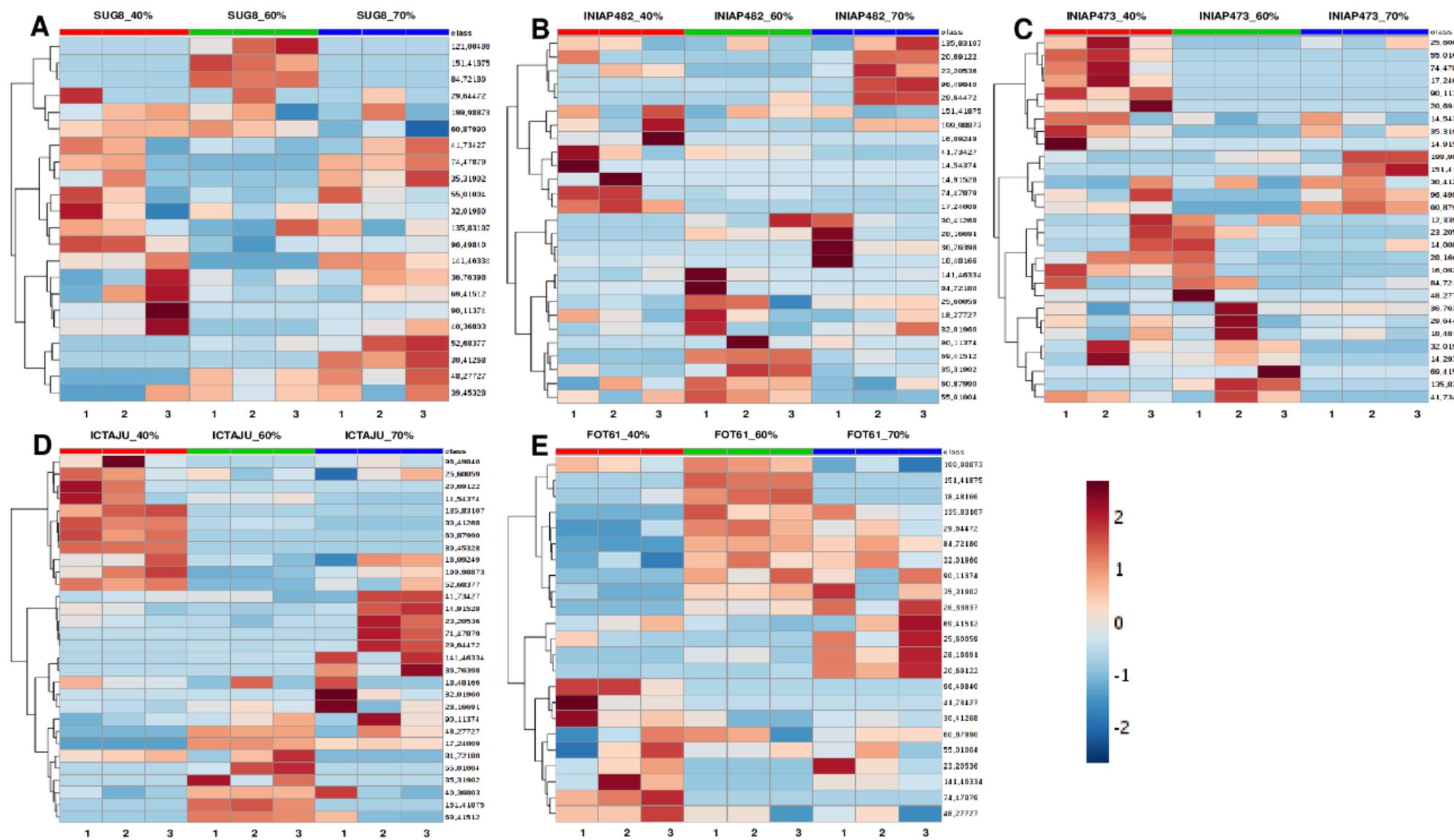


Figura 15 Mapa de calor. Análisis por condición hídrica.

Fuente: elaboración del autor.

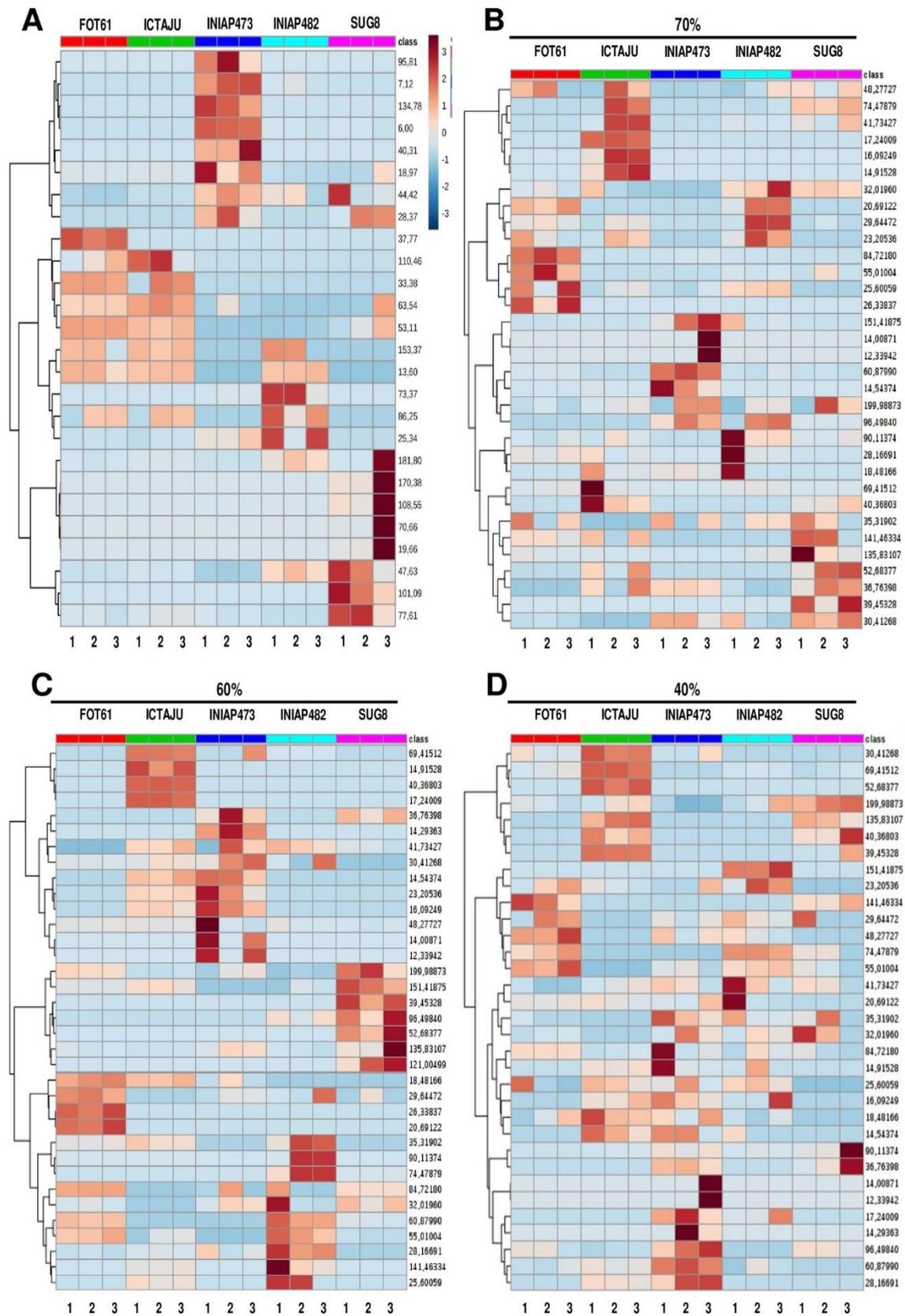


Figura 16 Mapa de calor. Análisis de variedades germinadas. Heatmap A de proteínas de semillas sin germinar vs B,C y D heatmap de cada tratamiento y como sus proteínas agrupadas según su peso molecular son diferentes. **Fuente:** elaboración del autor.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Las herramientas utilizadas permitieron la caracterización de los germinados de 5 variedades mejoradas de frejol común (*Phaseolus vulgaris*) sometidas a tres condiciones hídricas (70%: control de riego, 60%: estrés moderado y 40%: estrés severo). Mediante la identificación de las proteínas asociadas al estrés hídrico y la expresión diferencial de cada una entre las variedades germinadas y sus condiciones hídricas.

Los resultados nos permiten concluir que la variedad con mayor adaptación al estrés hídrico fue la INIAP 473 y la más susceptible la variedad INIAP 482. Por lo que se podría recomendar la primera para ser utilizada en los programas de mejoramiento genético del frejol común y para su siembra en condiciones climáticas de sequía como las que se presentan en la costa ecuatoriana.

4.2 Recomendaciones

Un ensayo en campo permitirá validar los resultados encontrados, ya que todas las variables fueron acondicionadas a laboratorio en condiciones de estrés severas.

Realizar geles bidimensionales para conocer todo el proteoma de los germinados de frejol además de otras técnicas como la espectrometría de masas, ya que nos indicaría cual es la identidad de las proteínas presentes en esta variedad.

BIBLIOGRAFÍA

Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of experimental botany*, 63(10), 3523-3543.

Casado-Vela, J. (2004). Aproximación cinética, molecular y proteómica al estudio de la podredumbre apical en frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* M.). Implicación de polifenol oxidase (PPO) y enzimas antioxidantes [Tesis de doctorado]. [Alicante (España)]: Universidad de Alicante. Departamento de Agroquímica y Bioquímica. Facultad de Ciencias, 231.

Cuevas-Velázquez, C. L., & Covarrubias-Robles, A. A. (2011). Las proteínas desordenadas y su función: una nueva forma de ver la estructura de las proteínas y la respuesta de las plantas al estrés. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 14(2), 97-105.

FAO 2016. Año Internacional de las Legumbres 2016. <http://www.fao.org/pulses-2016/es/>

Gepts, P., Debouck, DG 1991. Origen, domesticación y evolución del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). En: van Schoonhoven, A., Voysest, O. (eds.). *Frijoles comunes: investigación para el mejoramiento de cultivos*. Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, Reino Unido. pag. 7-53.

Graether, S. P., & Boddington, K. F. (2014). Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Frontiers in plant science*, 5, 576.

Hernández-López, V. M., Vargas-Vázquez, M., Luisa, P., Muruaga-Martínez, J. S., Hernández-Delgado, S., & Mayek-Pérez, N. (2013). Origen, domesticación y diversificación del frijol común: Avances y perspectivas. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(2), 95-104.

Jiménez, S., Castro, L., Yépez, J., & Wittmer, C. (2012). Impacto del cambio climático en la agricultura de subsistencia en el Ecuador. Fundación Carolina, Madrid, 26-45.

Jones, A. L. (1999). *Phaseolus bean: Post-harvest operations*. Post-harvest compendium. (Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome).

Lisar, S. Y., Motafakkerzad, R., Hossain, M. M., & Rahman, I. M. (2012). Water stress in plants: causes, effects and responses. In Water stress. InTech.

López Calvajar, G. A., López Fernández, R., & León González, J. L. (2017). Análisis de la influencia de factores climatológicos en la pérdida de superficie sembrada de cultivos transitorios en el Ecuador. *Revista Científica Agroecosistemas*, 5(1-Ext), 176-183.

Mederos, Y. (2013). Revisión bibliográfica INDICADORES DE LA CALIDAD EN EL GRANO DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cultivos Tropicales*, 27(3), 55-62.

Olvera-Carrillo, Y., Luis Reyes, J., & Covarrubias, A. A. (2011). Late embryogenesis abundant proteins: versatile players in the plant adaptation to water limiting environments. *Plant signaling & behavior*, 6(4), 586-589.

Ortega Maldonado, K. A. (2016). IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO EN VARIEDADES COMERCIALES DEL FRÉJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris*) DE ECUADOR” (Master's thesis, Universidad de Guayaquil, Dirección de Posgrado, Maestría en Biotecnología Molecular).

Park, C. J., & Seo, Y. S. (2015). Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones for plant immunity. *The plant pathology journal*, 31(4), 323.

Polanía, J. A. (2011). Identificación de características morfofisiológicas asociadas a la adaptación a sequía para ser usadas como criterios de selección en mejoramiento de frijol común. *Phaseolus vulgaris* L. Tesis (Ingeniero Agrónomo)[online].

Rodiño Míguez, A. P. (2001). Caracterización morfoagronómica y bioquímica de germoplasma de judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) de España. Universidad de Santiago de Compostela.

Zogli, P., & Libault, M. (2017). Plant response to biotic stress: Is there a common epigenetic response during plant-pathogenic and symbiotic interactions? *Plant Science*, 263, 89-93.