



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Identificación de marcadores moleculares asociados al
contenido de proteínas, almidón y fitoquímicos en
genotipos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.)**

TESIS

Que presenta

IBQ MARÍA FERNANDA QUINTERO SOTO

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIA

Y

TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Directores

DR JOSÉ ANTONIO GARZÓN TIZNADO

MC JEANETT CHÁVEZ ONTIVEROS

Culiacán, Sinaloa, México

Diciembre de 2015

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección del Dr. José Antonio Garzón Tiznado y la MC. Jeanett Chávez Ontiveros, así como la asesoría del Dr. José Ángel López Valenzuela. Contó con financiamiento del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) de la Universidad Autónoma de Sinaloa en su Convocatoria 2014. La IBQ María Fernanda Quintero Soto recibió beca de estudios de Maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y beca de terminación de tesis del PROFAPI.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán de Rosales, Sinaloa el día 2 del mes diciembre del año 2015, el (la) que suscribe IBQ. María Fernanda Quintero Soto alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos con número de cuenta 0510792-1, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. José Antonio Garzón Tiznado y MC. Jeanett Chávez Ontiveros y cede los derechos del trabajo titulado "Identificación de marcadores moleculares asociados al contenido de proteínas, almidón y fitoquímicos en genotipos de garbanzo (*Cicer arietinum L.*)", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "MARIA FERNANDA QUINTERO SOTO", written over a horizontal line.

IBQ. María Fernanda Quintero Soto

“¿Cuál es el punto de estar vivo si no intentas
al menos hacer algo notable?”

~John Green.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, especialmente a la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos (MCTA) - Facultad de Ciencias Químico Biológicas, por darme la oportunidad de ser parte de su programa y llevar a cabo una de mis metas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) de la Universidad Autónoma de Sinaloa, por el apoyo económico otorgado durante el desarrollo de este trabajo.

Al comité de tesis **MC Jeanett Chávez Ontiveros, Dr. José Antonio Garzón Tiznado y Dr. José Ángel López Valenzuela** por su paciencia y dedicación para la realización de este trabajo, por su confianza al haberme dado la de trabajar en este proyecto y ayudarme a cumplir esta meta personal. *¡A ustedes mi total respeto y admiración!*

A la **MC Milagros Ramírez Soto** por propagar y proporcionarme el material utilizado en el desarrollo del presente trabajo.

A todos los **Profesores de la MCTA**, quienes me compartieron sus conocimientos y favorecieron la adquisición de los mismos.

A los Laboratorios de Productos Naturales, de Bioprocesos (Lab 20), de Nutracéuticos (Lab 18), de Procesos Térmicos y de Ingeniería Genética de la FCQB por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

Agradezco especialmente a la **MC Jeanett Chávez Ontiveros**, por haberme dado la oportunidad de trabajar a su lado, gracias por la confianza que me brindó al dejarme participar en uno de sus proyectos, así como las enseñanzas y el apoyo en todo momento. *¡Muchas gracias!*

A mi asesor el **Dr José Ángel López Valenzuela** de quien he tenido la oportunidad de ser alumna tanto en el aula como en la vida. Gracias por el apoyo brindado, la comprensión y la paciencia. *¡Gracias por todo!*

A la **Dra Karen V. Pineda Hidalgo y Dra Nancy Yareli Salazar Salas** por toda su ayuda brindada, comprensión y paciencia para concluir esta etapa, por apoyarme en los momentos claves y brindarme su amistad en todo momento. *¡Mil Gracias!*

A todas las personas del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, más que compañeros, *¡Son familia!* **José Angel López, Jeanett, Karen, Yare, Elthon, María, Lulú, Anayanci, Erika, Milton, David, Alex, Glenda, Felipe, Itzel, Rodrigo y Christian.** Gracias por las risas y el apoyo.

A mis compañeros y amigos de generación **Karla, Jenny, Ana Luisa, Mariela, Brenda, Ana María, Karen y Rodolfo** con quienes he compartido muchísimas cosas.

A **Lulú y Anayanci**, mis “Hsofnflsk”, que además de ser mis compañeras de lab y generación son mis amigas. Gracias niñas por estos seis años de risas y alegrías por todos los momentos (buenos y malos) compartidos, por estar ahí siempre *¡Las quiero!*

A mis amigas de Lic. que ahora son amigas para toda la vida, **Melissa, Jessica, Korinthia**, y principalmente **Esmeralda**. Gracias Damitas por la comprensión y el apoyo en los momentos difíciles, por estar ahí para mí cuando yo no estaba para ustedes, por escucharme, por todo. *¡Son increíbles, las adoro!*

A mis tíos, primos y abuelos; principalmente a **Mamá Rosa**, la mejor abuela que jamás nadie en el mundo se pudiera imaginar. Gracias por toda tu ayuda, cariño y comprensión a lo largo de todos estos años. *¡Eres única!*

A **Jonhatan**, por la amistad, paciencia, cariño y amor. Gracias por hacer que mis sueños sean tuyos, por animarme siempre más allá de todos los límites, por perdonar mis impuntualidades y manías, y especialmente gracias, por hacerme reír en los momentos más difíciles. *¡Te amo!*

Por último, sería absurdo tratar de medir lo agradecida que me siento con mis padres, **Eunice y Fernando**, mis hermanos **Sandy e Iaan**, y mi sobrino **Maylon**. Los pilares de mi vida, los que me ha transmitido siempre la fuerza necesaria para continuar, los que nunca me han fallado, los que me han acompañado en los buenos y malos momentos. En cada línea y en cada palabra de esta tesis hay un poquito de ellos, su influencia, su apoyo, sus sugerencias y su compañía. Sólo espero ser capaz de devolverles algún día lo mucho que me han ayudado. *¡Son lo mejor que tengo!*

A Dios por todas sus bendiciones y por darme fuerza para cumplir esta meta.

ÍNDICE GENERAL

	Pág
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
I RESUMEN	1
ABSTRACT	3
II INTRODUCCIÓN	5
III REVISIÓN DE LITERATURA	7
A ASPECTOS GENERALES DEL GARBANZO	7
1 Origen y biología	7
2 Estructura del grano	9
3 Importancia económica	12
B CARACTERÍSTICAS NUTRIMENTALES Y NUTRACÉUTICAS DEL GRANO DE GARBANZO	13
1 Características nutrimentales	13
a Proteína	17
1) Globulinas	17
2) Albúminas	18
b Carbohidratos	21
1) Propiedades fisicoquímicas del almidón	21
2) Propiedades térmicas del almidón	22
3) Almidón resistente	24
2 Características nutraceuticas	26

a	Compuestos fitoquímicos	26
1)	Compuestos fenólicos	26
2)	Carotenoides	28
b	Actividad antioxidante	29
c	Actividad antimutagénica	31
C	MEJORAMIENTO Y DIVERSIDAD GENÉTICA DEL GARBANZO	32
1	Mejoramiento genético clásico	32
2	Mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares	34
a	Marcadores moleculares y sus aplicaciones	35
b	Diversidad genética e identificación de marcadores moleculares asociados con características agroalimentarias en garbanzo	36
IV	JUSTIFICACIÓN	40
V	OBJETIVOS	41
A	OBJETIVO GENERAL	41
B	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
VI	MATERIALES Y MÉTODOS	42
A	MATERIALES	42
B	MÉTODOS	42
1	Caracterización de proteínas	42
a	Determinación de proteína total	42
b	Extracción y cuantificación de las fracciones de proteína	46
c	Separación de las fracciones de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)	47

2 Contenido y propiedades fisicoquímicas del almidón	49
a Determinación de almidón total	49
b Aislamiento de gránulos de almidón	50
c Determinación de amilosa/amilopectina	51
1) Pretratamiento del almidón	51
2) Precipitación de amilopectina y determinación de amilosa	51
3) Determinación de almidón	52
d Determinación del grado de hinchamiento	53
e Propiedades térmicas del almidón	53
3 Caracterización fitoquímica	54
a Cuantificación de carotenoides totales	54
b Perfil de carotenoides	55
c Preparación de extractos metanólicos	56
d Compuestos fenólicos totales	57
e Perfil de compuestos fenólicos	57
4 Análisis genético	58
a Extracción de ADN	58
b Obtención de microsatélites	59
5 Análisis de asociación	63
6 Análisis estadístico	63
VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
A CONTENIDO Y PERFIL DE LAS PRINCIPALES PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO DEL GRANO EN LOS GENOTIPOS DE	64

GARBANZO	
1 Contenido de proteína total	64
2 Perfil de las principales fracciones de proteínas	66
a Globulinas	66
b Albúminas	68
B PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL ALMIDÓN EN LOS	72
GENOTIPOS DE GARBANZO ESTUDIADOS	
1 Composición y grado de hinchamiento	72
a Almidón total	72
b Contenido de amilosa	74
c Grado de hinchamiento	74
2 Propiedades térmicas	75
C PERFIL DE COMPUESTOS CAROTENOIDES Y FENÓLICOS	79
1 Contenido de carotenoides totales	79
2 Perfil de carotenoides	81
3 Contenido de compuestos fenólicos totales	87
4 Perfil de compuestos fenólicos	89
D VARIACIÓN ALÉLICA DE MICROSATÉLITES EN LOS GENOTIPOS	102
DE GARBANZO ESTUDIADOS	
E MAPEO DE ASOCIACIÓN	106
VIII CONCLUSIONES	110
IX BIBLIOGRAFÍA	111
ABREVIATURAS	130

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Pág.
1	Estructura del grano de garbanzo (<i>Cicer arietinum</i> L.)	10
2	Genotipos de garbanzo tipo desi de la colección de ICRISAT	44
3	Genotipos de garbanzo tipo kabuli de la colección INIFAP	45
4	Separación por SDS-PAGE de la fracción globulinas de garbanzo	67
5	Separación por SDS-PAGE de la fracción albúminas de garbanzo	70
6	Correlación entre el grado de hinchamiento y el contenido de amilosa en 15 genotipos de garbanzo	76
7	Cromatograma representativo del perfil de carotenoides correspondiente al genotipo de garbanzo ICC5613	82
8	Contenido de luteína de los genotipos de garbanzo estudiados	84
9	Contenido de zeaxantina de los genotipos de garbanzo estudiados	85
10	Contenido de β -caroteno de los genotipos de garbanzo estudiados	86
11	Cromatograma representativo del perfil de compuestos fenólicos correspondiente al genotipo de garbanzo ICC5613	90
12	Contenido relativo de ácido gálico en los genotipos analizados	92
13	Contenido relativo de ácido p-hidroxibenzoico en los genotipos	93

	analizados	
14	Contenido relativo de ácido siríngico en los genotipos analizados	94
15	Contenido relativo de quercetina en los genotipos analizados	96
16	Contenido relativo de genisteína en los genotipos analizados	98
17	Contenido relativo de catequina en los genotipos analizados	99
18	Contenido relativo de miricetina en los genotipos analizados	100
19	Contenido relativo de kaemferol en los genotipos analizados	101
20	Separación de los alelos del microsatélite TA200 en 5 individuos del genotipo ICC4418 (11-15) de la colección ICRISAT y 5 individuos de Hoga 021 (51-55) de la colección INIFAP	103

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Taxonomía del garbanzo	8
2	Principales países productores de garbanzo (2013)	14
3	Principales estados productores en México (2013)	15
4	Composición química del grano de garbanzo	16
5	Composición de aminoácidos esenciales en las proteínas de garbanzo	20
6	Genotipos de garbanzo (<i>Cicer arietinum</i> L.) utilizados	43
7	Composición del gel concentrador y gel separador utilizados en electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio	48
8	Características de los marcadores microsatelites utilizados	60
9	Contenido de proteína en los genotipos de garbanzo estudiados	65
10	Análisis densitométrico de la fracción de globulinas en los 15 genotipos de garbanzo evaluados	69
11	Análisis densitométrico de la fracción de albúminas en los 15 genotipos de garbanzo evaluados	71
12	Composición y grado de hinchamiento del almidón de los genotipos de garbanzo estudiados	73
13	Propiedades de gelatinización y retrogradación del almidón de los genotipos de garbanzo estudiados	77
14	Contenido de carotenoides totales de los genotipos de garbanzo	80
15	Contenido de fenólicos totales de los genotipos de garbanzo	88

	analizados	
16	Variación alélica y contenido de información polimórfica de los microsatélites utilizados	104
17	Mapeo de asociación de características nutrimentales y nutracéuticas en garbanzo	107

I RESUMEN

En México, el estado de Sinaloa es líder en la producción y exportación de garbanzo blanco (*Cicer arietinum* L.), una de las leguminosas de mayor importancia en la nutrición humana al ser una buena fuente de proteínas, carbohidratos y compuestos bioactivos con propiedades benéficas para la salud. El éxito del cultivo y comercialización de garbanzo depende del desarrollo de materiales competitivos, los cuales a la fecha se han obtenido por mejoramiento tradicional atendiendo principalmente características agronómicas. Este proceso podría facilitarse mediante el uso de selección asistida por marcadores moleculares. Además, dicha selección podría incorporar mayor valor agregado al grano si se relaciona con buenas propiedades nutrimentales y nutracéuticas. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue determinar la asociación entre marcadores moleculares y el contenido de proteína, almidón y fitoquímicos en genotipos de garbanzo. Se utilizaron 15 genotipos (9 tipo desi y 6 tipo kabuli) y se propagaron en el campo. Se les extrajo ADN y se analizaron con 30 microsatélites para determinar su variabilidad genética. También se determinó el perfil de las principales proteínas de almacenamiento (albúminas y globulinas) por electroforesis, carotenoides y compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución, así como el contenido y composición de almidón del grano. El perfil de globulinas mostró una mayor acumulación de Leguminas 11S y Vicilina 7S. La fracción albúminas presentó una amplia variabilidad entre los genotipos y una mayor proporción de Albúmina 2S. Los principales carotenoides identificados fueron luteína, zeaxantina y β -caroteno, mientras que en el caso de compuestos fenólicos se encontraron los flavonoides catequina, miricetina, genisteína, quercetina y kaemferol, así como los ácidos fenólicos gálico, p-

hidroxibenzoico y siríngico. Se encontró una amplia variabilidad en el contenido de estos compuestos, con una mayor acumulación de carotenoides y flavonoides en los genotipos tipo desi (granos de diferentes colores), mientras que los tipo kabuli (granos beige o crema) presentaron mayor contenido de ácidos fenólicos. El almidón total varió de 37.3 a 53.0 g/100 g harina y la amilosa de 20.4 a 31.4 g/100 g almidón. La variación de estas características y otras de calidad del grano determinadas previamente se utilizó para establecer asociaciones con los marcadores moleculares. Se encontró una asociación significativa ($p < 0.01$) entre las características y algunos marcadores moleculares reportados previamente en garbanzo ligados al contenido de proteína, peso y color del grano, destacando TA118 que se asoció con la mayoría de ellas. Los resultados demuestran una amplia variabilidad en características nutrimentales y nutracéuticas de los genotipos de garbanzo, lo cual permitió identificar marcadores moleculares con potencial uso en la selección asistida de características de interés alimentario en programas de mejoramiento de garbanzo.

ABSTRACT

In Mexico, Sinaloa state is the main producer and exporter of white chickpea (*Cicer arietinum* L.), one of the most important legumes in human nutrition because it represents a good source of proteins, carbohydrates and bioactive compounds with beneficial health effects. The success of the cultivation and marketing of this legume depends on the development of competitive materials, which up to date has been conducted by conventional breeding based just on agronomic traits. This process could be facilitated by using marker-assisted selection. Moreover, this selection could incorporate added value to the grain by taking into account nutritional and nutraceutical properties. Therefore, the objective of this study was to determine the association between molecular markers and protein, starch and phytochemicals content in chickpea genotypes. Fifteen chickpea genotypes were selected (9 desi type and 6 kabuli type) and propagated in the field. DNA was extracted from each genotype and probed with 30 microsatellites to determine the genetic diversity. Fractions of the major storage proteins (albumin and globulin) were separated by electrophoresis, carotenoids and phenolic compounds profiles were analyzed by high performance liquid chromatography, while starch content and composition were determined using commercial kits. The globulin fraction revealed a greater accumulation of 11S legumins and 7S vicilins, while albumin fraction showed a wide variability among the genotypes and a higher proportion of 2S albumins. The main carotenoids identified were lutein, zeaxanthin and β -carotene, while the identified phenolic compounds included the flavonoids catechin, myricetin, genistein, quercetin, and kaempherol, as well as the phenolic acids gallic, p-hydroxybenzoic and syringic. The genotypes showed a wide variability in the levels of these compounds; greater

accumulation of carotenoids and flavonoids were observed in desi genotypes (grains of different colors), while kabuli genotypes (beige or cream grains) had higher levels of phenolic acids. Starch content varied from 37.3 to 53.0 g/100g flour and amylose from 20.4 to 31.4 g/100g starch. The variability of these characteristics and other grain quality traits previously determined were used to establish associations with molecular markers. The characteristics showed a significant association ($p < 0.01$) with some molecular markers previously reported to be linked to protein content, seed weight and color, highlighting the TA118 marker that showed association with the majority of the characteristics. The results showed a wide variability in nutritional and nutraceutical characteristics of the chickpea genotypes that allowed to identify molecular markers with potential use in breeding programs for chickpea quality traits.

II INTRODUCCIÓN

El garbanzo (*Cicer arietinum L.*) constituye un recurso alimenticio de gran importancia en la dieta humana debido a su alto valor nutritivo, ya que es una buena fuente de proteínas, carbohidratos, fibra dietaria, ácidos grasos insaturados y minerales (Ladizinsky 1995); además, posee diversos compuestos fitoquímicos con actividades biológicas, entre los que destacan compuestos fenólicos y carotenoides (Chavan y col 1987; 1989) a los cuales se les atribuyen distintas propiedades benéficas para la salud (Dueñas y col 2004).

El garbanzo se encuentra dentro de las tres leguminosas más importantes a nivel mundial, después del frijol y el chícharo, con una producción en el año 2013 de 13,118,698 ton (FAOSTAT 2015). México ocupó el sexto lugar en producción mundial con 209,941 ton, siendo el estado de Sinaloa líder nacional en producción, aportando 122,246 ton para el mismo año (SAGARPA 2015). Sinaloa también ocupa un lugar importante en el mercado de exportación compitiendo con países como Turquía, España y Australia (FAOSTAT 2015).

Las exigencias de cultivo y comercialización de esta leguminosa requieren el desarrollo constante de nuevos materiales, lo cual a la fecha se ha realizado mayormente mediante esquemas de mejoramiento tradicional. Este proceso podría facilitarse mediante selección asistida por marcadores moleculares asociados a características de interés agroalimentario. En este sentido, en los últimos años ha habido grandes avances en el análisis del genoma del garbanzo, dando lugar a la caracterización de un gran número de marcadores moleculares (Hüttel y col 1999; Sethy y col 2006b; Varshney y col 2007; Choudhary y col 2009; Hiremath y col 2012; Kujur y col 2013), al desarrollo de varios mapas genéticos (Nayak y col 2010; Thudi y

col 2011), a la identificación de marcadores o loci de caracteres cuantitativos (QTL) asociados con características de interés (Pfaff 2003; Abbo y col 2005; Varshney y col 2013a; Thudi y col 2014) y a la secuenciación del genoma (Varshney y col 2013b).

En Sinaloa, a partir del establecimiento del Campo Experimental Valle de Culiacán (CEVACU) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) a principios de la década de 1960, se inició el estudio científico de la problemática del garbanzo en la región, dando lugar a la introducción y formación de nuevas variedades (Manjarrez y col 2003). Mediante la introducción y evaluación de germoplasma de los diferentes centros como el Instituto de Investigación Internacional de Cultivos para las Zonas Tropicales Semiáridas (ICRISAT) y Centro Internacional de Investigaciones Agrícolas en Zonas Áridas (ICARDA) se lograron detectar genotipos con resistencia a la “rabia”, enfermedad ocasionada por hongos del género *Fusarium*. Sin embargo, se requiere la caracterización molecular de estos materiales para identificar marcadores moleculares asociados con características de interés agroalimentario para apoyar en el mejoramiento del cultivo del garbanzo. Además de las características de resistencia y calidad del grano, también es importante tomar en cuenta características de tipo alimentario (funcionales, nutricionales y nutraceuticas) para darle un mayor valor agregado a la producción de esta leguminosa y expandir su mercado, por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar la asociación entre marcadores moleculares y el contenido de proteína, almidón y fitoquímicos de genotipos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.).

III REVISIÓN DE LITERATURA

A ASPECTOS GENERALES DEL GARBANZO

1 Origen y biología

Diversos investigadores sugieren que el centro de origen del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) se sitúa en el sureste de Turquía, basándose en la presencia de diferentes especies anuales silvestres fuertemente relacionadas con el garbanzo: *C. reticulatum* Ladizinsky y *C. echinospermum* (Ladizinsky 1975). Evidencias de carácter botánico y arqueológico sugieren que el garbanzo fue domesticado en Medio Oriente y ampliamente cultivado en la India, Cuenca Mediterránea y Etiopía desde la antigüedad, extendiéndose posteriormente a América y Australia. Durante el siglo XVI, los Españoles y Portugueses introdujeron el garbanzo al continente Americano, donde las condiciones ambientales favorables permitieron su rápida expansión, principalmente en México, llegando a ser un producto de gran importancia comercial, lo que originó que se convirtiera en el principal competidor del garbanzo producido en España (ASERCA 1997).

Los genotipos de garbanzo se dividen en tipo desi y kabuli; los primeros se caracterizan por poseer granos coloridos y tamaño pequeño, cuyo cultivo data de hace unos 5000 años en la India y regiones tropicales semiáridas. Los de tipo kabuli fueron desarrollados posteriormente por selección y mutación (Singh y Ocampo 1997), los cuales poseen granos más grandes y de color claro.

En lo que respecta a su taxonomía, el garbanzo pertenece a la familia FABACEAE, subfamilia Papilionoides, tribu *Cicereae*, género *Cicer* (Cuadro 1), el cual comprende 43 especies, 9 anuales y 34 perennes (Taylor y Ford 2007; Singh y

Cuadro 1. Taxonomía del garbanzo.

Categoría	Ejemplo
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	FABACEAE
Subfamilia	Papilionaceae
Tribu	<i>Cicereae</i>
Género	<i>Cicer</i>
Subgénero	<i>Pseudononis</i>
Sección	<i>Monocicer</i>
Serie	<i>Arietina</i>
Especie	<i>arietinum</i>

Taylor y Ford (2007)

col 2008a), siendo *Cicer arietinum* L. la única especie domesticada, agronómica y económicamente importante (Crispín y López 1976). Dentro de la subfamilia Papilionoides se encuentran esencialmente la totalidad de los cultivos de leguminosas importantes como el garbanzo, el cual está más estrechamente relacionado con cultivos como la alfalfa (*Medicago sativa*), trébol (*Trifolium spp.*), chícharos (*Pisum sativum*) y lenteja (*Lens culinaris*) (Varshney y col 2013a).

La planta de garbanzo se reproduce por autofecundación. A este tipo de plantas se les conoce como plantas autógamas y se caracterizan porque las anteras liberan el polen sobre el propio estigma, que está receptivo, con la flor cerrada, evitando de esta manera la entrada de polen extraño (Cubero 2002). Dicha planta es anual con una altura que varía entre 30 a 70 cm. El follaje está cubierto de pelos glandulares que secretan exudados altamente ácidos que se consideran importantes por conferir tolerancia a las plagas de insectos, tales como el barrenador de la vaina. Las hojas son compuestas, dispuestas en una forma alternada con 11 a 13 folíolos. Las flores son axilares, solitarias o en inflorescencias de dos o tres, de color blanco, rosa, púrpura o azul. La planta cuenta con un sistema de raíces profundas y se considera un cultivo resistente. Produce nódulos en común con otras leguminosas y es eficiente en la fijación de nitrógeno atmosférico, así como en la absorción de fósforo en los suelos que contienen bajas cantidades del mismo (ICRISAT 2015).

2 Estructura del grano

El grano de garbanzo presenta tres componentes principales: la cubierta o testa de la semilla, los cotiledones y el embrión (Figura 1). La testa corresponde a la capa más externa del grano, la cual por lo general es moderadamente gruesa y sus

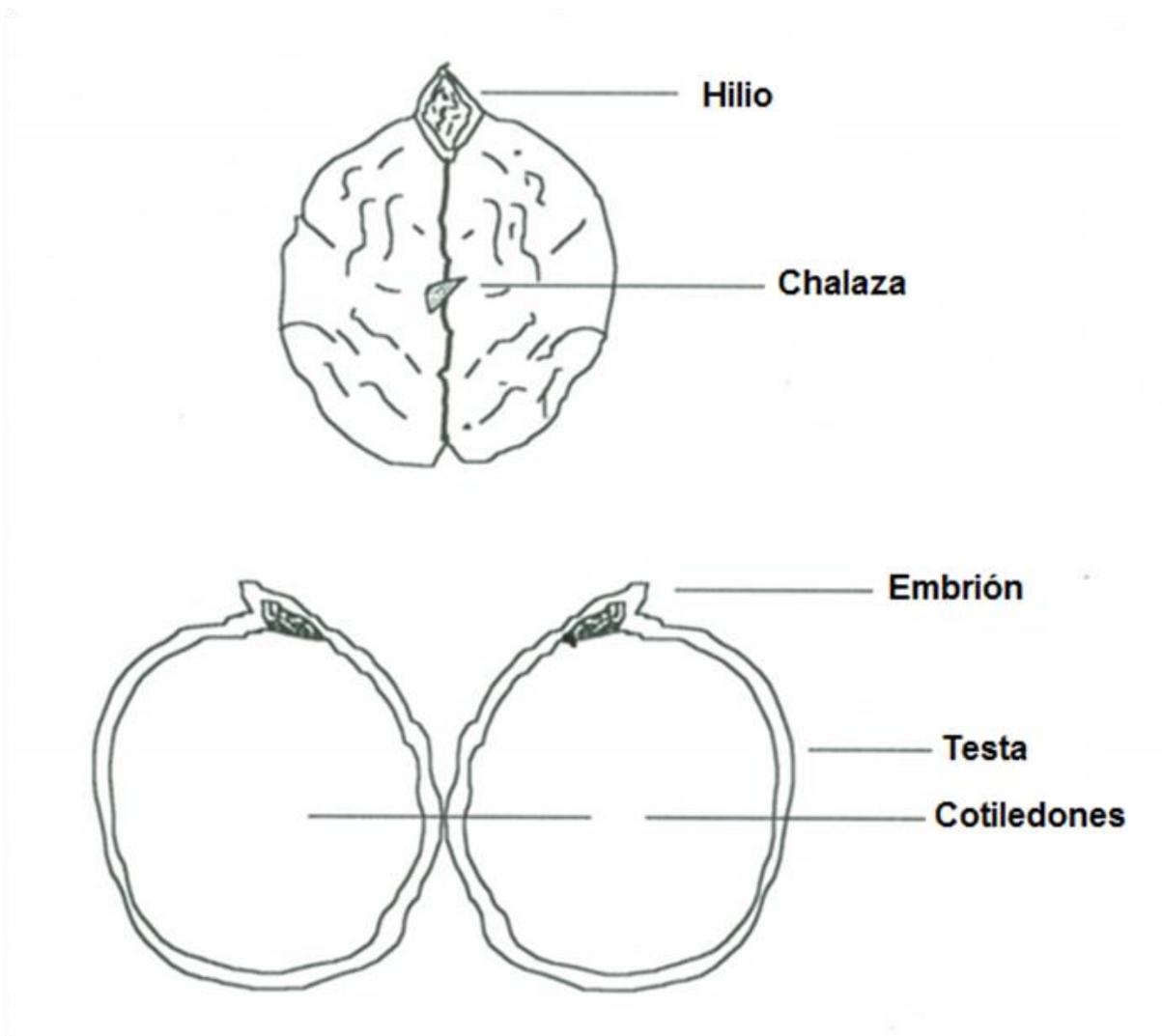


Figura 1. Estructura del grano de garbanzo (*Cicer arietinum* L.).

Kadam y col (1989).

células se asocian con la dureza del grano. Cuando dicha cubierta se remueve por remojo, el endospermo se libera con ella. En la mayoría de las leguminosas, el endospermo en la madurez se reduce a una pequeña capa alrededor del cotiledón o embrión (Kadam y col 1989). En cuanto al cotiledón, éste representa alrededor del 84% del peso del grano seco y contiene gránulos de almidón embebidos en una matriz proteínica que está formada de cuerpos proteínicos (Cubero 1987; Chavan y col 1989).

El garbanzo también posee estructuras externas, las cuales son el hilio (hilium), micrópilo y rafé. El hilio es una larga cicatriz oval que aparece hacia la mitad de la madurez, donde la semilla se desprende del tallo. Muestra una gran diferencia en forma y tamaño, variando desde redonda a oblonga y de oval a elíptica. El micrópilo es una pequeña apertura en la cubierta de la semilla hacia el lado del hilio y es el sitio donde el tubo polínico se introduce al ovario. Dicha estructura está situada debajo del hilio y varía desde circular y triangular a una forma de tenedor. El rafé es un canal hacia el lado del hilio y opuesto al micrópilo, representa la base del tallo, el cual se fusiona con la cubierta del grano durante la madurez. A lo largo de la cubierta de la semilla, tanto el hilio y el micrópilo han sido relacionados con la permeabilidad de la testa o absorción de agua de las leguminosas (Cubero 1987; Kadam y col 1989).

La parte restante del grano está compuesta por la estructura embrionaria, la cual incluye a la raíz y un eje embrionario corto localizado por encima y debajo del cotiledón, el cual tiene diversas hojas foliadas y termina en la punta del tallo. La plúmula o tallo embrionario está bien desarrollado en la semilla y está localizado

entre los dos cotiledones. Así mismo, la radícula y raíz embrionaria casi no tienen protección, excepto por la que provee la cubierta de la semilla (Kadam y col 1989).

El garbanzo se divide en diferentes tipos basándose en las características de su semilla y distribución geográfica. Comercialmente se manejan dos tipos: desi y kabuli. El tipo desi, cuyo origen es en India, presenta flores moradas y sus granos son pequeños, angulares y pueden ser de color café, marrón, amarillo, naranja, negro o verde (Chavan y col 1989; Knights 1994; Pittaway 2006; Wood y col 2008). Este tipo de garbanzo se sitúa en el peso de 12 a 20 g por 100 granos y es producido en el subcontinente Indio, en África Oriental, Asia Central y a un grado limitado de la palangana de Mediterráneo (Cobos y col 2007). En México, el tipo desi se emplea principalmente en la alimentación animal (Oplinger y col 1997).

El garbanzo tipo kabuli es originario de las regiones del Mediterráneo y Medio Oriente, sus plantas presentan flor blanca, sus semillas son grandes y redondas y de color blanco a crema (Chavan y col 1989; Knights 1994). Su peso varía de 25 a 60 g por 100 granos (Taylor y Ford 2007). Dicho garbanzo se utiliza principalmente para consumo humano y es cultivado en muchas regiones geográficas incluyendo Asia del Sur, Asia Occidental, África Norte y Oriental, Europa del Sur, América del Norte y Australia del Sur (Oplinger y col 1997).

3 Importancia económica

Las leguminosas son uno de los alimentos básicos más importantes principalmente para países en vías de desarrollo, ya que proporcionan una fuente barata de proteína comparada con la de origen animal, y al igual que los cereales, han sido de los primeros alimentos cultivados en todo el mundo, representando una

muy buena fuente de energía en forma de carbohidratos en la dieta (Ladizinsky 1995).

El garbanzo es la tercera leguminosa más importante a nivel mundial después del frijol y el chícharo, cuyo cultivo se encuentra principalmente en países en desarrollo, los cuales contribuyen con más del 90% de la producción mundial, la cual en el año 2013 fue de 13,118,698 ton (Cuadro 2) (FAOSTAT 2015). La India fue el principal país productor de garbanzo con cerca del 70% del total, seguido por Australia y Pakistan, mientras que México ocupó el sexto lugar con 209,941 ton en ese mismo año. A nivel nacional, Sinaloa fue el principal estado productor de garbanzo contribuyendo con un 58.2% del total en el año 2013 (Cuadro 3), seguido de Sonora que para ese mismo año aportó un 31.3% (SAGARPA 2015).

B CARACTERÍSTICAS NUTRIMENTALES Y NUTRACÉUTICAS DEL GRANO DE GARBANZO

1 Características nutrimentales

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) posee un alto valor nutritivo en la dieta humana, ya que es una buena fuente de hidratos de carbono, ácidos grasos insaturados (oleico, linoleico), minerales (Ca, Fe, Cu, Zn, P, K y Mg), vitaminas (niacina, tiamina, ácido ascórbico) y principalmente proteínas, superando al huevo y a la leche (Cuadro 4) (Ladizinsky 1975). A continuación se describen algunas de las características nutrimentales más importantes del grano de garbanzo.

Cuadro 2. Principales países productores de garbanzo (2013).

País	Producción (ton)
India	8,832,500
Australia	813,300
Pakistán	751,223
Myanmar	490,000
Irán	295,000
México	209,941
Canadá	169,400
República Unida de Tanzania	110,116
Otros	1,447,219
Total	13,118,698

FAOSTAT (2015)

Cuadro 3. Principales estados productores en México (2013).

Estado	Producción (ton)
Sinaloa	122,246
Sonora	65,670
Baja California Sur	13,960
Michoacán	4,368
Jalisco	1,980
Otros	1,713
Total	209,941

SAGARPA (2015)

Cuadro 4. Composición química del grano de garbanzo.

Parámetro	Tipo desi		Tipo kabuli	
	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.
Proteína ^a	16.7	30.6	12.6	29.0
Cenizas ^a	2.0	4.2	2.0	3.9
Lípidos ^a	2.9	7.4	3.4	8.8
Ac. Linoleico(18:2) ^d	45.9	61.5	16.4	70.4
Ac. Linolénico (18:3) ^d	2.1	4.8	0.3	3.3
Carbohidratos total ^a	50.6	64.9	54.2	70.9
Almidón ^a	32.0	56.3	30.0	57.2
Amilosa ^b	20.0	41.0	23.0	47.0
Azúcares solubles ^a	5.3	11.8	6.6	7.5
Azúcares totales ^a	2.2	10.7	5.5	10.8
Fibra cruda ^a	3.7	13.0	1.1	4.9
Vitaminas				
Tiamina ^c	-	0.4	-	0.5
Niacina ^c	-	1.5	-	1.7
Vitamina E ^c	-	0.8	0.8	13.7
Minerales				
Calcio ^c	68	269	103	259
Magnesio ^c	107.4	168	119	167
Zinc ^c	2.2	20.0	2	5.4
Hierro ^c	3.0	9.8	3	9.8

^a Porcentaje en base seca (%; bs); ^b Porcentaje de almidón; ^c mg/100g; ^d Porcentaje de aceite

Wood y Grusak (2007)

a Proteínas

El garbanzo se encuentra clasificado dentro de los granos con alto contenido de proteínas, cuyos valores en los tipo desi varían de 16.7 a 30.67%, mientras que en los de tipo kabuli estos se encuentran entre 12.6 y 29.0% (Wood y Grusak 2007). Las proteínas de reserva más importantes en garbanzo son las globulinas (solubles en soluciones salinas) representando un 57% de la proteína total, seguido de las glutelinas (solubles en ácidos o bases) que se encuentran en un 18%, las albúminas (solubles en agua) con un 12% y las prolaminas (solubles en alcohol) con un 3% (Singh y Jambunathan 1982). La distribución de estas fracciones proteínicas varía considerablemente entre el embrión, cotiledón y testa del grano. Los cotiledones poseen la mayoría de las globulinas, glutelinas y albúminas del grano, con alrededor del 47% del total de proteína. La testa del grano aporta alrededor del 48% de la proteína total y contiene principalmente nitrógeno no proteico y glutelinas, mientras que el embrión es relativamente rico en albúminas que constituyen el 5% de la proteína del grano (Singh y Jambunathan 1982; Chavan y col 1989).

1) Globulinas

Las globulinas son sintetizadas por los ribosomas asociados al retículo endoplásmico rugoso e incluyen un péptido señal que las dirige al lumen donde el péptido señal es cortado co-traduccionalmente; posteriormente son exportadas al aparato de Golgi de donde son transportadas mediante vesículas a las vacuolas de almacenamiento de proteínas (PSV) de la semilla donde se depositan (Casey y col 1986). Las globulinas se componen de dos grandes grupos de proteínas, 11S (legumina) y 7S (vicilina) (Casey y col 1993). Las proteínas 11S son las principales y

poseen una estructura oligomérica integrada por seis subunidades que interactúan mediante enlaces no covalentes y cuyos pesos moleculares se encuentran entre 56 y 60 kDa, por lo que el peso molecular total de la proteína es de aproximadamente 320-400 kDa (Casey y col 1993). Bajo condiciones de separación desnaturalizantes (SDS-PAGE), cada subunidad da lugar a un polipéptido ácido (α) (37-40 kDa) y uno básico (β) (24-27 kDa), los cuales están unidos por un enlace disulfuro (Sánchez-Vioque y col 1999). La proteína vicilina 7S es trimérica, formada por subunidades de 40 a 70 kDa que pueden ser iguales o diferentes; el procesamiento proteolítico puede permitir en algunas especies la generación de polipéptidos más pequeños, mientras que el polimorfismo puede resultar de la glicosilación. Las vicilinas no pueden formar enlaces disulfuro debido a que las subunidades que las componen carecen de cisteína. La subunidad inicial tiene un peso de 50 kDa pero debido a un extensivo procesamiento postraduccional del tipo proteolítico y glicolítico, se convierte en subunidades cuyo tamaño varía considerablemente. Por ejemplo, las subunidades de vicilina del chícharo se sintetizan inicialmente como polipéptidos de 47 a 50 kDa, aunque después del procesamiento postraduccional se convierten en subunidades de 12 a 33 kDa (Casey y col 1993).

2) Albúminas

La fracción de albúminas juega un papel esencial ya que incluye la mayor parte de las proteínas enzimáticas y metabólicas (Casey y col 1993), encontrando en esta fracción proteínas como la lipoxigenasa y la albúmina 2S. La lipoxigenasa (linoleato: oxígeno oxidoreductasa) es un tipo dioxigenasa que cataliza la incorporación de oxígeno molecular en moléculas que contengan un sistema 1,4-pentadieno

(Hildebrand y col 1988). Los sustratos específicos para la lipoxigenasa son ácidos grasos poliinsaturados con estructura 1,4-pentadieno; los más comunes con este tipo de estructura dentro del reino vegetal son los ácidos linoleico y linolénico. El producto de la reacción es un hidroperóxido conjugado ya que el doble enlace atacado por el oxígeno se traslada para entrar en conjugación con el doble enlace vecino (Sanz 1992). Estos hidroperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados actúan como intermediarios para un gran número de rutas metabólicas divergentes. Tal es el caso de la cooxidación de pigmentos, ya que para que la cooxidación tenga lugar se necesita la presencia tanto de la enzima como del ácido graso (Sanz 1992). La proteína albúmina 2S presenta un peso molecular de aproximadamente 20 kDa y se compone de dos polipéptidos de 10 y 12 kDa (Vioque y col 1999). La función principal de la albúmina 2S es de reserva; sin embargo, algunos componentes han mostrado actividad biológica como inhibidores de proteasas y como proteínas de defensa (Svendsen y col 1994). En cuanto al valor nutricional, en la fracción de albúminas se ha observado un mejor balance de aminoácidos esenciales en comparación con las otras fracciones (Cuadro 5). La composición de aminoácidos esenciales en las proteínas de garbanzo, ricas en lisina y pobres en los de tipo azufrados (cisteína y metionina), hace que las leguminosas sean muy útiles tanto en la alimentación animal como en la humana porque sus proteínas complementan a las de los cereales en dietas pobres o en dietas sin proteína animal (Huïsmán y Van der Poel 1994).

Cuadro 5. Composición de aminoácidos esenciales en las proteínas de garbanzo.

Aminoácido (g/100 g proteína)	Proteína total^a	Albuminas^a	Globulinas^a	Glutelinas^a	Infantes^b	Niños^b	Adultos^b
Treonina	3.93	5.21	2.95	4.35	4.3	3.4	0.9
Valina	4.06	4.55	2.95	5.05	5.5	3.5	1.3
Metionina + Cisteína	1.95	4.75	0.99	1.87	4.2	2.5	1.7
Isoleucina	3.83	4.27	4.05	4.52	4.6	2.8	1.3
Leucina	7.73	7.18	7.81	7.68	9.3	6.6	1.9
Tirosina + Fenilalanina	9.01	7.71	9.64	9.18	7.2	6.3	1.9
Triptofano	0.62	0.7	0.78	1.09	1.7	1.1	0.5
Lisina	7.31	9.33	6.61	7.89	6.6	5.8	1.6
Histidina	2.86	3.02	3.08	2.99	2.6	1.9	1.6

^a Tavano y col (2008); ^b Patrón de aminoácidos recomendado por la FAO (2015).

b Carbohidratos

El grano de garbanzo contiene entre 52 y 71% de carbohidratos, siendo el almidón el principal componente. El resto de los carbohidratos están constituidos por azúcares reductores y no reductores, así como fibra cruda (4.8-9.3%) (Singh 1985). Por ser el almidón el carbohidrato mayoritario del grano a continuación se describen algunas de sus principales características.

1) Propiedades fisicoquímicas del almidón

El almidón es depositado en forma de gránulos, particularmente cristalinos, cuya morfología, composición química y estructura molecular son características particulares de cada especie de planta (James y col 2003). Dependiendo del tipo de garbanzo, el contenido de almidón puede variar ocupando aproximadamente el 45% en el grano tipo desi y el 41% en el tipo kabuli (Meares y col 2004). El almidón, debe gran parte de su funcionalidad a dos componentes principales de alto peso molecular, amilosa y amilopectina, así como a la organización física de estas macromoléculas en la estructura granular (James y col 2003). La amilosa es un homopolisacárido esencialmente lineal formado de moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -1,4; mientras que la amilopectina es un homopolisacárido de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -1,4 y además ramificado con enlaces glucosídicos α -1,6 (Zeeman y col 2007). En garbanzo tipo desi, el 26.1% del total del almidón corresponde a amilosa y en tipo kabuli el porcentaje de amilosa es similar con un 26.4% (Meares y col 2004).

2) Propiedades térmicas del almidón

La estabilidad, propiedades fisicoquímicas y estructurales del almidón dependen grandemente de la naturaleza de las regiones cristalinas y amorfas del almidón nativo. Debido a ello, muchas técnicas han sido aplicadas para probar el orden estructural de los polímeros del almidón, destacando técnicas como la calorimetría diferencial de barrido (DSC), la cual es una técnica experimental dinámica que nos permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante, durante un tiempo determinado o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante, en un determinado intervalo de temperaturas (Suriñach y col 1992).

Debido a su estructura semicristalina, los gránulos de almidón son insolubles en agua a temperatura ambiente. Cuando estos son colocados en suficiente agua, los gránulos de almidón tienden a absorber una parte y se hinchan. Cuando se calienta el almidón, ocurre una pérdida del orden estructural debido al desarreglo molecular de los polímeros amilosa y amilopectina. Se ha demostrado que el rompimiento del orden estructural dentro de los gránulos de almidón está caracterizado por ser un proceso endotérmico llamado transición de orden-desorden (Cooke y Gidley 1992). Esta reacción endotérmica es conocida como gelatinización y corresponde a la disociación de las moléculas de almidón de una estructura de doble hélice (cristalina) en los gránulos de almidón en una conformación amorfa, incrementando la viscosidad de la pasta formada y la digestibilidad enzimática (Srichuwong y Jane 2007). Este proceso de gelatinización es medido a partir de DSC; el almidón es calentado a una velocidad constante conocida y los cambios en la capacidad de calor

es medida en función de la temperatura (Wang y col 1998), registrándose la temperatura (T_g) y entalpía de gelatinización (ΔH_g).

La gelatinización comienza con la absorción de agua en la región amorfa, los puentes de hidrógeno son más débiles y menos rígidos en esta región, y no tan numerosos como en las regiones cristalinas. Cuando la parte amorfa se ha hidratado completamente, la cristalina inicia un proceso semejante pero requiere mayor energía (entalpía de gelatinización), cuando se alcanza cierta temperatura (temperatura de gelatinización, 65-75°C) el gránulo hinchado, se rompe parcialmente alterando significativamente su estructura debido a la solubilización de la amilosa y amilopectina. La amilosa comienza a difundirse hacia el agua y la amilopectina queda dentro del gránulo para posteriormente perder su orden, la amilosa fuera del gránulo forma una malla y produce un gel (Biliaderis 1991). La gelatinización y el hinchamiento del gránulo son controlados en parte por la estructura molecular de la amilopectina (longitud de cadena, patrón de ramificaciones, peso molecular), la composición del almidón (relación amilosa/amilopectina y contenido de fósforo) y la arquitectura del gránulo (Tester 1997).

La temperatura y entalpía de gelatinización son parámetros que han sido relacionados con las características del gránulo de almidón, así como el grado de cristalinidad (Krieger y col 1998). Se ha reportado que una alta temperatura de gelatinización indica un alto grado de cristalinidad, lo cual provee una estabilidad estructural y hace más resistente al gránulo a la gelatinización (Barichello y col 1990).

Las interacciones moleculares (puentes de hidrógeno entre las cadenas de almidón) durante el enfriamiento del almidón posterior a la gelatinización ha sido

denominada retrogradación (Hoover 2001). El material amorfo, obtenido después de la gelatinización no se encuentra en un estado de equilibrio, presentándose entonces una tendencia a un proceso de re-asociación y re-cristalización de las cadenas del polisacárido (Eliasson y Gudmundsson 1996). En varios estudios se ha demostrado que la retrogradación de la amilopectina sucede en un periodo de tiempo mayor que el de la amilosa (Miles y col 1985) probablemente debido a la magnitud de su estructura. Durante el proceso de retrogradación, las fracciones de amilosa o las secciones lineales de amilopectina forman una zona con organización cristalina muy rígida. En la amilosa, se lleva a cabo un ordenamiento conformacional de sus cadenas, constituidas de 40 a 70 unidades de glucosa como mínimo, las cuales se orientan paralelamente e interaccionan entre sí por puentes de hidrógeno para formar dobles hélices (Oostergetel y van Bruggen 1993).

3) Almidón resistente

El almidón es uno de los componentes principales de la dieta humana (Skrabanja y col 1999) y hasta hace algunos años era considerado como un carbohidrato disponible que era completamente digerido y absorbido en el intestino delgado de los humanos. Sin embargo, se observó que una fracción del almidón resiste la hidrólisis por las enzimas digestivas. Esta fracción se denomina almidón resistente y fue definida por la EURESTA (Del inglés, European Research Project on Resistant Starch) como la suma de almidón y productos de su degradación que no pueden ser absorbidos en el intestino delgado de individuos sanos. El almidón resistente sigue su tránsito por el intestino delgado y llega al intestino grueso, donde es fermentado por las bacterias de la flora normal del colon. Como producto de la

fermentación se generan ácidos grasos de cadena corta con una alta proporción de butirato (Englyst y Cummings 1987). Los ácidos grasos de cadena corta producto de la fermentación del almidón resistente, así como la velocidad y el nivel de digestión del almidón, afectan diversas funciones fisiológicas y tienen efectos benéficos en la salud, tales como la reducción de la respuesta glucémica e insulinémica al alimento, un efecto hipocolesterolémico y un efecto protector contra el cáncer colorrectal (Cassidy y col 1994).

Englyst y col (1992) propusieron una clasificación para el almidón resistente que se basa en la naturaleza del almidón y el alimento que lo contiene. El almidón resistente 1 corresponde al almidón físicamente inaccesible, atrapado en la matriz celular, tal como sucede en las leguminosas (Würsch y col 1986; Tovar y col 1992a). El almidón resistente 2 son los gránulos nativos, que no han sido sometidos al proceso de cocción y por su naturaleza cristalina son menos susceptibles a la hidrólisis (Englyst y Cummings 1987; Faisant y col 1995). El almidón resistente 3 es el almidón retrogradado, él cual se forma en los alimentos que han sido cocinados y almacenados. Durante el enfriamiento la molécula de amilosa se reasocia formando estructuras semicristalinas resistentes a la hidrólisis enzimáticas (Englyst y Cummings 1987). Las leguminosas contienen, además del almidón, altos niveles de fibra dietética, lo cual da una alta resistencia a la pared celular evitando su ruptura durante su cocimiento. Esto, aunado a la presencia de ciertos factores antinutricionales, hace que el almidón de las leguminosas tenga una baja digestibilidad. Además, las leguminosas procesadas contienen cantidades significativas de almidón resistente 1, almidón resistente 2 y almidón resistente 3, lo que las hace particularmente interesantes (Tovar y col 1992b; Bravo y col 1998).

Como resultado, la velocidad de digestión del almidón y la liberación de glucosa al torrente sanguíneo es lenta después de ingerir leguminosas, lo cual causa bajas respuestas glucémicas e insulinémicas posprandiales, en comparación con las de cereales o tubérculos (Tovar y col 1992b).

2 Características nutraceuticas

a Compuestos fitoquímicos

Los compuestos fitoquímicos mas estudiados son los compuestos fenólicos, tales como flavonoides, catequinas, isoflavonas, lignanos, glucosinolatos, fitoesteroles y terpenoides (Kalogerolopoulus y col 2010; Pennington y Fisher 2010). También se ha hecho énfasis en el estudio de los compuestos carotenoides, de los cuales se sabe que juegan un papel importante como agentes antioxidantes en la nutrición humana (Luthria y col 2006). Para la mayoría de los fitoquímicos todavía no se conocen bien sus bases moleculares, ni sus interacciones con otros componentes dietéticos.

1) Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos representan uno de los grupos de metabolitos secundarios más abundantes en las leguminosas y son considerados como antioxidantes naturales (Dueñas y col 2004). Estos compuestos antioxidantes reaccionan con radicales libres y le ceden un electrón oxidándose y transformándose en radicales libres débiles, con escasos o nulos efectos tóxicos. Los compuestos fenólicos se originan principalmente a través de dos rutas metabólicas, la ruta del ácido shikímico y la de los poliacetatos. Sin embargo, algunos de los compuestos fenólicos considerados como principios activos de las plantas medicinales se originan

a través de rutas mixtas, que combinan la vía del shikimato y del acetato, tal es el caso de los flavonoides (Bennick 2002). Otra ruta alternativa, es la que se desarrolla a través de la combinación de la vía del malonato con la vía del shikimato, dando origen a los compuestos terpénicos (furanos y piranocumarinas, etc.).

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Dicha capacidad antioxidante les permite dar protección a las personas frente a los fenómenos de daño oxidativo y proporcionar efectos terapéuticos en un elevado número de enfermedades, incluyendo la cardiopatía isquémica, la arterosclerosis o el cáncer (Pace y col 1995). Dentro de las evidencias experimentales que indican que el efecto benéfico para la salud de los flavonoides junto con polifenoles se ejerce como consecuencia de sus propiedades antioxidantes, se encuentra el efecto inhibitor que ejercen sobre enzimas prooxidantes como xantina oxidasa, mieloperoxidasa, lipoxigenasa y ciclooxigenasa (Redrejo-Rodriguez y col 2004; Meotti y col 2008; Pauff y Hille 2009), su acción como agente quelante de iones metálicos (Sugihara y col 1999) y su capacidad para captar radicales libres (Liu y col 2010).

Diversos estudios muestran una correlación entre el consumo de alimentos con alto contenido de compuestos fenólicos como frutas, vegetales, cereales y leguminosas, y una disminución en la incidencia de distintas enfermedades como cáncer y enfermedades cardiovasculares (Anderson y col 1999; Kushi y col 1999; Kris-Etherton y col 2002). En garbanzo se han identificado una gran diversidad de compuestos fenólicos, la mayoría de ellos derivados de ácidos fenólicos y flavonoides (Mekky y col 2015). Sreerame y col (2010) identificaron cinco

compuestos del tipo flavonoide (miricetina, genisteína, daidzeína, quercetina y kaemferol) en testa y cotiledón de garbanzo, reportando valores de flavonoides totales de casi el doble en testa (12.6 mg CAE/g muestra) con respecto al cotiledón (7.5 mg CAE/g muestra). En garbanzo tipo desi, Zia-UI-Haq y col (2008) reportaron contenidos de flavonoides totales en un rango de 0.79-0.99 mg CAE/g muestra (bs) para cuatro variedades originarias de Pakistán. Xu y Chang (2007) determinaron el contenido de flavonoides totales de diferentes leguminosas utilizando diferentes solventes de extracción, obteniendo mayores valores de flavoides en garbanzo al utilizar acetona al 80% (3.16 mg CAE/g muestra).

2) Carotenoides

Los carotenoides son compuestos muy importantes no es solo por su función como pigmento, sino también porque se les han atribuido actividades biológicas como lo son un aumento en el sistema inmune y una disminución del riesgo de enfermedades degenerativas, tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, degeneración muscular relacionada con la edad y formación de cataratas (Ziegler 1991; Krinsky 1994). Estos efectos biológicos se atribuyen a una propiedad antioxidante de los carotenoides a través de la desactivación de los radicales libres (átomos o grupos de átomos que poseen un electrón no compartido) y la captura del oxígeno singulete. La luteína y la zeaxantina están presentes en la mácula de la retina, las cuales son efectivas contra la degradación macular relacionada con la edad (Atienza y col 1998).

De todos los carotenoides, el β -caroteno es el más ampliamente distribuido en plantas y uno de los más eficientes en la conversión de vitamina A (Reifen 2002). Sin

embargo, en el caso del grano de garbanzo los carotenoides que se encuentran en mayor proporción son luteína y zeaxantina, seguido en menor proporción por β -caroteno, α -caroteno, violaxantina y β -criptoxantina (Abbo y col 2005, Ashokkumar y col 2015). Los valores promedio de luteína reportados por estos autores fueron 0.28 y 0.62 mg/100 g harina para garbanzo tipo kabuli y desi, respectivamente, mientras que para zeaxantina observaron valores de 0.16 y 0.23 mg/100 g. En el caso de β -caroteno se encontraron valores de aproximadamente 49 μ g/100 g de harina y le siguen en menor proporción α -caroteno (5 μ g/100 g de harina) y β -criptoxantina (2.6 μ g/100 g de harina).

b Actividad antioxidante

El garbanzo contiene compuestos antioxidantes, los cuales son sustancias que retrasan, previenen o eliminan el daño oxidativo de una molécula (Saxena y col 2007). Las células en proliferación como las células del sistema inmunológico son particularmente susceptibles al estrés oxidativo, el cual se define como el estado celular caracterizado por un exceso en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o reducción de defensas antioxidantes (Donkena y col 2010). Las especies reactivas de oxígeno pueden alterar la estructura de las membranas lipídicas y del ADN, incluyendo modificaciones de bases, ruptura de la cadena y rearrreglos cromosómicos, que pueden causar alteraciones en los patrones de metilación (Donkena y col 2010).

La actividad antioxidante de los distintos grupos de compuestos depende de la estructura individual y del número de hidroxilos sustituyentes, así como del peso molecular. En flavonoides, esta característica se asocia con la presencia en la

molécula de grupos orto dihidroxi en el anillo B, un doble enlace entre el C2 y C3 en conjunto con la posición 4-oxo en el anillo C y grupos 3-5 hidroxilo, y la función 4-oxo en los anillos A y C (Velioglu y col 1998).

Un gran número de frutas y hortalizas frescas se consideran fuentes primarias de antioxidantes y un alto consumo de éstas ha demostrado tener efectos protectores sobre el desarrollo de padecimientos crónicos como enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (Kalogeropoulos y col 2010). Los compuestos antioxidantes más estudiados son los compuestos fenólicos; Oomah y col (2011) reportaron que el contenido de fenólicos totales de distintas leguminosas se correlacionó significativamente con su actividad antioxidante, sugiriendo que los compuestos fenólicos son los principales contribuyentes de dicha actividad.

Zia-Ul-Haq y col (2008) reportaron valores de actividad antioxidante (ORAC) para garbanzo tipo desi de la India en un rango de 858 a 1140 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ muestra (bs). Recientemente, Heiras-Palazuelos (2012) reportó un rango de valores ORAC de 5011 a 5756 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ muestra (bs) en cinco genotipos de garbanzo tipo desi crecidos en el estado de Sinaloa, demostrando el potencial que tienen estos materiales como fuente de mejora de la actividad antioxidante.

Además de las propiedades antioxidantes presentadas por un gran número de compuestos fitoquímicos, recientemente se ha reportado la presencia de péptidos con actividad antioxidante en leguminosas como soya y garbanzo (Moure y col 2006; Kou y col 2013). Dentro de las propiedades antioxidantes asociadas a estos péptidos se incluyen su habilidad para inactivar especies reactivas de oxígeno, secuestrar radicales libres, además de impedir la penetración de iniciadores de la oxidación de lípidos por la formación de una capa protectora alrededor de las moléculas de lípidos

(Moure y col 2006; Zhu y col 2008). Kou y col (2013) evaluaron la capacidad antioxidante de hidrolizados de albúmina de garbanzo, reportando porcentajes de inhibición de 23% a 43% mediante el método DPPH, demostrando el potencial antioxidante que presentan dichos hidrolizados.

c Actividad antimutagénica

El cáncer es un problema de salud cuyo desarrollo se ha correlacionado con varios factores ambientales (dieta, estilo de vida y fumar); alrededor del 35% de los casos de cáncer podrían asociarse con la dieta (Doll 1992; Beninger 2005). Un evento clave en su desarrollo es la ocurrencia de mutaciones en el ADN y la modulación de la mutagenicidad que puede alterar el efecto de compuestos genotóxicos, por lo que se ha incrementado el interés sobre la actividad de las sustancias antimutagénicas presentes en los alimentos (Rodríguez y col 2009).

Las plantas o alimentos de origen vegetal representan la principal fuente de metabolitos con actividades antimutagénicas y anticarcinogénicas y varios estudios han mostrado una relación entre estas actividades y la actividad antioxidante (Johnson 2003; Rocha y col 2007).

Recientemente, Garzón-Tiznado y col (2013) evaluaron la actividad antimutagénica de tres genotipos de garbanzo tipo desi mediante el ensayo de microsuspensión utilizando la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*, obteniendo valores de porcentaje de inhibición de 57.8 a 62.3%. Esta actividad se correlacionó positivamente con el contenido de fenólicos totales y actividad antioxidante, lo que sugiere que los compuestos fenólicos son los mayormente responsables de estas actividades. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para determinar los

mecanismos involucrados en estos efectos, así como ampliar el número de genotipos y características evaluadas, con la finalidad de relacionar estas propiedades con la variación genética molecular y poder utilizar esta información en programas de mejoramiento.

C MEJORAMIENTO Y DIVERSIDAD GENÉTICA DEL GARBANZO

1 Mejoramiento genético clásico

El cultivo de garbanzo actualmente enfrenta problemas que amenazan su permanencia como cultivo estratégico en la región. Los problemas con la rabieta del garbanzo se han ido acentuando en regiones como el Valle del Évora, en donde la falta de un sistema de rotación de cultivos ha acentuado la presencia de la enfermedad. Además, la aparición de enfermedades foliares como roya, moho gris, moho blanco, junto con la presencia de plaga como el gusano del soldador, han acentuado los problemas fitopatológicos del cultivo (Manjarrez y col 2004).

Las primeras variedades mejoradas de garbanzo blanco tipo kabuli para el Noroeste de México obtenidas por selección individual fueron: Unión, Angostura, Culiacán 860 (grano blanco, calibre 42-46 semillas por 30 g, color crema claro) y Sinaloa. Durante los 70's y 80's se obtuvieron otras variedades como Surutato 77, Sonora 80 y Santo Domingo 82, las cuales presentaban además de mejor rendimiento y calidad, resistencia al ataque de *Fusarium*, misma que se introdujo de garbanzo forrajero. Con el trabajo de INIFAP se han ido liberando variedades como Tubatama 88, Mocorito 88 y Blanco Sinaloa 92, Hermosillo 93, Pictic 93, Costa 2004, Suprema 03, Jumbo 2010 y Blanoro. A continuación se describen las principales características de algunas variedades.

Surutato fue el resultado entre la variedad Macarena y una línea del tipo porquero resistente a la rabia. La variedad es tolerante a hongos del género *Fusarium* (Morales y Jaime 1993). La variedad Santo Domingo 82 es resultado de la cruce entre la Línea L-41 con Breve Blanco. Se liberó por su alta resistencia a la rabia. Mocerito 88 es el resultado de la cruce de la Línea 558 con surutato 77, después la cruce resultante se polinizó con la cruce de la Línea Precoz 221 con 314 con tolerancia a rabia (Gómez-Garza 1990). La variedad Progreso 95 se originó de la cruce de Santo Domingo 82 con IL-72, una línea de porte erecto. Se liberó por dicha característica de porte erecto y pensando en el mercado que presentan países del norte de África, Árabes y Latinoamericanos (Gómez-Garza y Salinas-Pérez 2001). Otra variedad liberada por el INIFAP es Jamu 96, la cual proviene de la cruce de la línea experimental Santo Domingo 82 x Blanco Lechoso y es hermana de Blanco Sinaloa 92 (Manjarrez y col 2003). La variedad Blanco Sinaloa 92 ha significado para los productores de Sinaloa y de México, el despliegue no sólo en la superficie sembrada, sino también en la productividad. Blanco Sinaloa 92 también es producto de la cruce de Santo Domingo 82 con Blanco Lechoso (Gómez-Garza y col 2003a). Pitic 93 se obtuvo por hibridación de la cruce múltiple L-1794 con resistencia a la rabia con la variedad Macarena de alto rendimiento y calidad. Después se cruzó con la Línea L-1855-Sur con la finalidad de obtener resistencia a la rabia, alto rendimiento, calidad y porte erecto para cosecha mecánica directa (Morales 1999). La variedad Tequi Blanco 98 proviene de una cruce triple; la Línea L-4294 de porte erecto y resistencia a rabia se cruzó con la Línea Hermosillo con calidad y posteriormente la cruce resultante se cruzó con la variedad Blanco Lechoso, la cual fue introducida de España y posee grano blanco y grande, ciclo tardío, porte semi

erecto, grano alargado y un rendimiento promedio de 2,471 kg/ha (Morales 1999). Al igual que Pitic 93, Desierto 98 proviene de una cruce múltiple en la cual se cruzó la Línea L-1794 resistente a rabia con la variedad Macarena de buena calidad y susceptible, la cruce obtenida se cruzó con la variedad introducida Blanco Lechoso (Morales 1999). La variedad Suprema 03 como línea experimental se denominó IIGaC87.1-M-17-M-4-M-M y se originó de la cruce de las líneas hermanas IIGaC83.1-M-81-M2-27 x IIGaC83.1-M-77-M2-38. Los progenitores provenían de la cruce de Santo Domingo-92 x Blanco Lechoso (Gómez y col 2003b). La variedad Costa 2004 tiene su origen de la cruce simple de las variedades Tubutama 88 y Blanco Sinaloa 92 (Gutiérrez y Navejas 2009). Jumbo 2010 se introdujo como la línea experimental Hoga-508, originada de la cruce simple de la variedad Dwelley x Blanco Sinaloa 92 siendo Dewlley una variedad comercial de grano claro originaria de Washington, Estados Unidos. Cabe señalar que Jumbo 2010 es una variedad de hábito semi-erecto, calibre 36-38 semillas/30 g de peso, color blanco cremoso, de rugosidad pronunciada, conserva la característica de grano grande y tiene resistencia a *Fusarium oxysporum f sp. Ciceris*. En cuanto a Blanoro se originó de la cruce triple de L-4924 x Blanco Lechoso x Blanco Sinaloa 92; es una buena variedad de garbanzo con mayor productividad y resistencia a *Fusarium oxysporum f sp. Ciceris*, que además logra rendimientos de 2,694 Kg/ha, con grano de calidad de exportación.

2 Mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares

El empleo de herramientas de biología molecular ha facilitado el estudio de las bases genéticas de la variación natural de caracteres complejos involucrados en la

aptitud, adaptación al ambiente y evolución de las poblaciones. También ha facilitado el escrutinio de grandes colecciones de recursos genéticos para identificar regiones cromosómicas, genes o polimorfismos involucrados en la variación de caracteres agronómicos que pueden ser utilizados en programas de mejoramiento genético, lo que requiere analizar la diversidad genética preferentemente con marcadores moleculares neutros o de ADN y relacionar el genotipo de estos marcadores con la variación fenotípica del carácter de interés mediante un análisis estadístico (Nei y Kumar 2000).

a Marcadores moleculares y sus aplicaciones

Los marcadores moleculares corresponden a cualquier gen cuya expresión permite un efecto cuantificable u observable (características fenotípicas) y puede detectarse fácilmente. Este tipo de marcadores pueden evaluarse desde que los individuos están en sus primeros estadios de desarrollo y se pueden aplicar usando todo el individuo o sólo parte de él (Rafalski y Tingey 1993). Es importante resaltar que un marcador molecular se considera como marcador genético si se transmite según las leyes básicas de la herencia mendeliana (Klug y col 2006). Los marcadores moleculares se dividen en bioquímicos y de ADN.

Para evaluar la diversidad genética molecular se recomienda el uso de marcadores de ADN, los cuales presentan varias ventajas, entre ellas que no son afectados por el ambiente, están presentes en cualquier estado de desarrollo y permiten una detención temprana, son abundantes, requieren poca cantidad de tejido para obtener el ADN y son específicos para cada individuo (huella genética). Entre dichos marcadores se tienen RFLP (Polimorfismo en el tamaño de fragmentos de

restricción), RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), AFLP (Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados) y SSR (Repetición de secuencias sencillas).

Las aplicaciones de los marcadores moleculares son muy diversas e incluyen la diferenciación de individuos, análisis filogenéticos y taxonómicos, mapeo genético, cuantificación de variabilidad génica intra e interespecífica, mejoramiento genético, localización de resistencia a enfermedades, entre otras (Rafalski y Tingey 1993).

En el caso particular de los marcadores microsatélites (SSR), estos consisten en mono-, di-, tri- y tetranucleótidos repetidos en tándem en el genoma. Este ADN, que es muy polimórfico, se utiliza como marcador molecular (Tautz y Renz 1984) cuando el motivo repetido se clona y secuencia para diseñar indicadores que se utilizarán para su ampliación por PCR. Los fragmentos amplificados son separados mediante electroforesis en geles de agarosa o acrilamida; fragmentos de un mismo tamaño representan un alelo. La ventaja principal de los marcadores SSR es la velocidad y especificidad con la que se puede realizar los análisis una vez que las parejas de iniciadores se han establecido claramente, además de que son codominantes y altamente reproducibles.

b Diversidad genética e identificación de marcadores moleculares asociados con características agroalimentarias en garbanzo

El conocimiento y manejo de la diversidad genética es muy importante para cualquier programa de mejoramiento. Al principio los mapas genéticos de garbanzo se basaron en marcadores morfológicos e isoenzimas, pero debido a su bajo polimorfismo no fueron exitosos y se optó por el uso de mapas con marcadores de ADN (Sharma y Muehlbauer 2007; Radhika 2007). Dichos marcadores han sido de

gran utilidad para establecer relaciones genéticas entre especies del género *Cicer* (Shan y col 2005). La mayoría de estos trabajos ha reportado una gran diversidad en materiales silvestres del género *Cicer* pero una variación más limitada en garbanzo cultivado. En estudios iniciales la secuencia de los marcadores de RFLP reveló niveles muy bajos del polimorfismo (Vrinda 2001). Entre los marcadores moleculares actualmente disponibles, los microsatélites o SSR son seleccionados por su naturaleza multialélica, herencia codominante, abundancia y amplia cobertura del genoma (Gupta y Varshney 2000); la interpretación es relativamente simple y el análisis genético de marcadores de un sólo locus los hace superiores a marcadores de ADN multilocus, sobre todo para la construcción de mapas y marcaje de ADN (Thomas y Scott 1993).

La utilidad de los SSR para detectar variación genética intraespecífica en el garbanzo fue demostrada por Hüttel y col (1999), en donde 16 loci detectaron de 2 a 4 alelos a nivel intraespecífico de 22 loci probados en 4 accesiones; en el caso particular de los marcadores CaSTMS10 y CaSTMS15 se detectaron 25 y 16 alelos, respectivamente, cuando se probaron en 63 accesiones de garbanzo de ubicaciones geográficas diferentes, reflejando valores de diversidad genética de 0.937 y 0.922 respectivamente. Considerando el nivel bajo de la variación intraespecífica revelada por otros tipos de marcadores estos valores son muy altos. Sethy y col (2006a) usaron 25 marcadores SSR polimórficos para analizar la diversidad genética intraespecífica dentro de 36 colectas de garbanzo de diferente ubicación geográfica, observando valores promedios de heterocigocidad observada y esperada de 0.32 (0.08-0.91) y 0.74 (0.23-0.89), respectivamente. La reproducción y secuenciación de la variante de tamaño de los alelos en dos microsatélites reveló que los números

variables de repeticiones de AG en alelos diferentes eran la fuente principal de polimorfismo.

Debido a los problemas de tipo biótico y abiótico que afectan el rendimiento del cultivo de garbanzo, la mayoría de las investigaciones se han enfocado en la búsqueda y desarrollo de marcadores moleculares asociados con estas características. En este sentido, se han realizado varios esfuerzos encaminados para caracterizar un gran número de microsatélites en garbanzo (Sethy y col 2006a; Varshney y col 2007). El polimorfismo encontrado con estos marcadores ha permitido el desarrollo de mapas genéticos para la identificación de loci asociados con algunos caracteres de interés agronómico, como la enfermedad de la rabia causada por el hongo *Fusarium* (Sharma y Muehlbauer 2007) y la enfermedad de la plaga *Ascochyta* (Kottapalli y col 2009).

Existen pocos reportes en la literatura en relación con la identificación de loci o marcadores asociados con características de calidad del grano en garbanzo. Un ejemplo de ello es el trabajo realizado por Abbo y col (2005), quienes realizaron un mapeo genético en una población derivada de la cruce entre los genotipos de garbanzo Cr205 (silvestre) y Hadas (kabuli), indentificando cuatro QTL asociados con el contenido de luteína, uno con β -caroteno y tres con el peso de 100 granos. Castañeda-Dominguez (2011) encontró una asociación significativa ($p < 0.001$) entre características de calidad del grano (calibre, peso de 100 granos y porcentaje de testa) y marcadores SSR en genotipos de garbanzo de la colección de INIFAP e ICRISAT. Saeed y col (2013) identificaron 11 SSR asociados a características agronómicas (Suceptibilidad a la plaga *Ascochyta*, tolerancia al frio, peso de 100 granos y rendimiento), destacando el marcador TS84 que se encontró asociado con

la mayoría de las características evaluadas. Recientemente, Jadhav y col (2015) analizaron la variación en el contenido de proteína cruda en 30 genotipos de garbanzo y la relacionaron con el genotipo de 23 SSR; se identificaron 19 microsatélites asociados al contenido de proteína distribuidos en los grupos de ligamiento LG1, LG2, LG3, LG4 y LG5, demostrando el uso potencial de estos marcadores para el mejoramiento de garbanzo. Sin embargo, se requieren más estudios para identificar marcadores moleculares asociados con características nutrimentales y nutraceuticas para darle mayor valor agregado a la producción de garbanzo y expandir su mercado.

IV JUSTIFICACIÓN

El garbanzo es una de las leguminosas de mayor importancia en la nutrición humana ya que es una buena fuente de proteínas, carbohidratos, fibra dietaria, ácidos grasos insaturados y compuestos fitoquímicos con actividades biológicas, entre los que destacan los compuestos fenólicos y carotenoides. El cultivo de garbanzo presenta diversos problemas de tipo biótico y abiótico que afectan su rendimiento y calidad, por lo que la mayoría de las investigaciones en diferentes regiones del mundo se han enfocado hacia la búsqueda y desarrollo de marcadores moleculares asociados con estas características para auxiliar en programas de mejoramiento. En Sinaloa, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ha venido estudiando la problemática del garbanzo en la región; mediante la introducción y evaluación de germoplasma de los diferentes centros como el ICRISAT e ICARDA, se lograron detectar genotipos con resistencia a la “rabia”, enfermedad ocasionada por hongos del género *Fusarium*. No obstante estos esfuerzos, el cultivo de garbanzo aún enfrenta problemas de tipo biótico y abiótico que amenazan su permanencia como cultivo estratégico en la región; a la fecha no existen trabajos que relacionen la diversidad molecular del germoplasma de garbanzo utilizado por el CEVACU-INIFAP con las características agroalimentarias que poseen. Además de las características de resistencia y calidad del grano, también es importante tomar en cuenta características de tipo alimentario para darle un mayor valor agregado a la producción de este grano y expandir su mercado. Por ello, en el presente trabajo se plantea relacionar la diversidad molecular de genotipos de garbanzo de interés alimentario con el contenido de proteínas, almidón y fitoquímicos.

V OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Identificar marcadores microsatélites asociados al contenido de proteína, almidón y fitoquímicos en genotipos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.).

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar las principales proteínas de almacenamiento en 15 genotipos de garbanzo de interés alimentario.
2. Determinar el contenido y propiedades fisicoquímicas del almidón de los genotipos de garbanzo estudiados.
3. Caracterizar los perfiles de carotenoides y compuestos fenólicos en los genotipos de garbanzo.
4. Determinar la variación alélica de marcadores microsatélites en los genotipos de garbanzo.
5. Evaluar asociaciones entre la variación alélica de los microsatélites y las características evaluadas.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

A MATERIALES

Se utilizaron un total de 15 genotipos de garbanzo (*Cicer arietinum* L), cuyo nombre y origen se indican en el Cuadro 6. Dentro de ellos se incluyen 9 genotipos tipo desi (Figura 2) provenientes de la colección del Banco Mundial de Germoplasma del Instituto Internacional de Investigación de Cultivos para Zonas Tropicales Semiáridas (ICRISAT), así como 6 genotipos tipo kabuli (Figura 3) facilitados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Estos materiales fueron cultivados bajo condiciones de riego en el Campo Experimental Valle de Culiacán (CEVACU) del INIFAP. Se colectó tejido vegetativo de cinco plantas de cada genotipo para el análisis genético y se almacenó a -70 °C hasta la extracción de ADN. También se cosecharon granos maduros y se almacenaron a 25 °C hasta su uso.

B MÉTODOS

1 Caracterización de proteínas

a Determinación de proteína total

Se utilizó el método 46.12 (microKjeldahl) de la AOAC (1999) para la determinación de nitrógeno mediante un sistema Kjeltec modelo 1009 y 1002 (Tecator, Suecia). Se sometieron a digestión 0.2 g de muestra con 5 mL de ácido sulfúrico y la mezcla reactiva de selenio (Merck Co., Alemania) a una temperatura de 200 °C. Posteriormente, la muestra se diluyó con 10 mL de agua y se sometió a destilación, para lo cual se emplearon disoluciones de NaOH al 40% y ácido bórico al 4 % con indicador para recibir el destilado.

Cuadro 6. Genotipos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) utilizados.

Genotipo	Color de grano	País
Colección ICRISAT		
ICC 6306	Negro	Rusia
ICC 4418	Negro	Irán
ICC 3761	Negro	Irán
ICC 3512	Café	Irán
ICC 5383	Café	India
ICC 13124	Café	India
ICC 14872	Café	India
ICC 5613	Verde	India
ICC 3421	Beige	Israel
Colección INIFAP		
Blanco Sinaloa 92	Beige	México
Jumbo 2010	Beige	México
Blanoro	Beige	México
Progreso 95	Beige	México
Hoga 340	Beige	México
Hoga 021	Beige	México

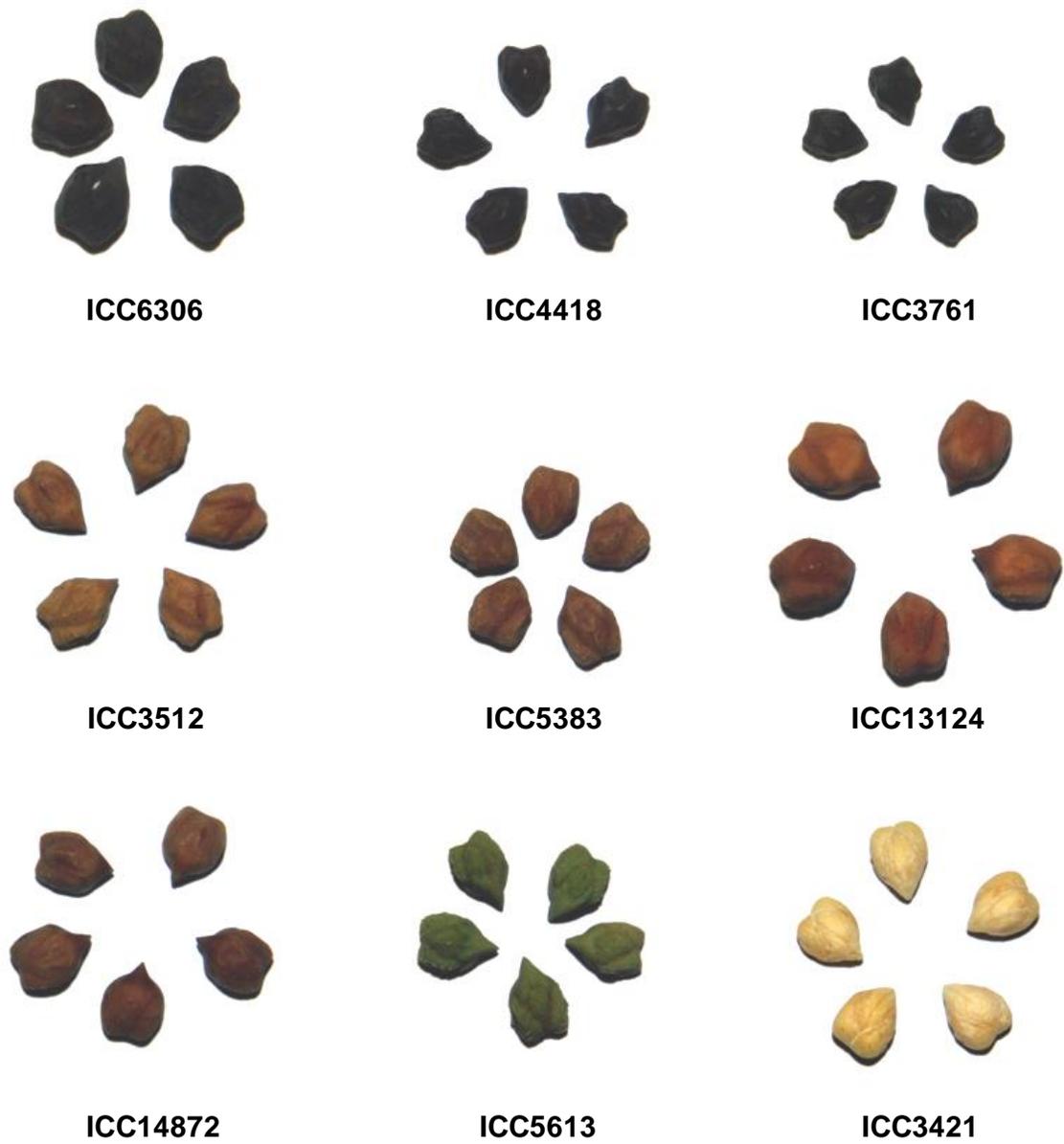


Figura 2. Genotipos de garbanzo tipo desi de la colección de ICRISAT.



BLANCO SINALOA 92



JUMBO 2010



BLANORO



PROGRESO 95



HOGA-340



HOGA-021

Figura 3. Genotipos de garbanzo tipo kabuli de la colección INIFAP.

La titulación se llevó a cabo con una disolución valorada de HCl 0.1 N. El contenido de proteína cruda se calculó multiplicando el contenido de nitrógeno total por el factor 6.25. La prueba se realizó por triplicado.

b Extracción y cuantificación de las fracciones de proteína

La extracción de las fracciones de proteína se realizó mediante el método descrito por Dziuba y col (2014) con algunas modificaciones. Se mezclaron 50 mg de harina con 1 mL de hexano y se agitó durante 4 h a 20 °C. La mezcla se centrifugó a 10,000 g durante 15 min, se eliminó el sobrenadante y a la pastilla se le adicionó 1 mL de buffer de extracción I (H₂O desionizada estéril pH 8.0, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 10 mM, PMSF 1 mM), seguido de agitación durante 4 h a 20 °C en un termomezclador (Eppendorf, Hamburg, Alemania). La mezcla se centrifugó (12,000 g, 60 min) y se recuperaron el sobrenadante y la pastilla (residuo 1); el sobrenadante se dializó contra agua por 3 días con tres cambios al día, el dializado se centrifugó (10,000 g, 60 min), se recuperó de nuevo el sobrenadante y se llevó a sequedad en un concentrador modelo 5301 (Eppendorf) para obtener la fracción de albúminas. Para continuar con la extracción de proteínas se agregó 1 mL de buffer de extracción II [Tris-HCl 0.1 M (pH 8.0), NaCl 10 % (p/v), PMSF 1 mM, EDTA 10 mM] al residuo 1 y la mezcla se agitó durante 16 h a 20 °C en un termomezclador (Eppendorf). Después de centrifugar a 10,000 g por 60 min, se recuperó el sobrenadante y se dializó de la misma manera que la fracción de albúminas. Finalmente, el dializado se centrifugó (10,000 g, 60 min) y se recuperó la pastilla correspondiente a la fracción de globulinas.

La concentración de albúminas y globulinas se determinó colorimétricamente utilizando el método descrito por Bradford (1976), el cual consiste en la formación de un compuesto de color azul entre los residuos de aminoácidos básicos de las proteínas y el colorante azul de Coomassie G-250, el cual presenta un máximo de absorción a 595 nm. La concentración se estimó a partir de una curva de calibración construida utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como proteína estándar.

c Separación de las fracciones de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

La separación de proteínas se realizó por SDS-PAGE de acuerdo con el protocolo de Laemmli (1970). Se utilizó una unidad electroforética vertical MP3 (BioRad, Hercules, CA, EUA) y una fuente de poder EC600-90 (Thermo EC, Waltham, MA, USA). Se usaron marcadores de peso molecular (BioRad): miosina, 201.237 kDa; β -galactosidasa, 114.317 kDa; albúmina de suero bovino, 74.141 kDa; albúmina de huevo, 48.044 kDa; anhidrasa carbónica, 34.435 kDa; inhibidor de tripsina de soya, 27.236 kDa; lisozima, 17.086 kDa y aprotinina, 6.246 kDa.

Los extractos de albúminas y globulinas (equivalentes a 5 mg y 0.5 mg de harina, respectivamente) se mezclaron con un volumen equivalente de amortiguador de muestra [Tris-HCl 62.5 mM (pH 6.8), SDS 2 % (p/v), glicerol 25 % (v/v), 2-mercaptoetanol 5 % (v/v), azul de bromofenol 0.01 %] y después se aplicaron en pozos de geles de poliacrilamida de 12.5 % (p/v) para su separación (Cuadro 7). Las proteínas en el gel se visualizaron por tinción durante 2 h con una solución de azul brillante de Coomassie R-250 al 0.25 % (p/v) (Sigma, St Louis, MO, EUA) en 40 % de

Cuadro 7. Composición del gel concentrador y gel separador utilizados en electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio.

Reactivo	Gel concentrador (10 mL)	Gel separador (10 mL)
	4%	12.5%
Acrilamida 30% (p/v):	1.3 mL	4.2 mL
Bisacrilamida 2.67% (p/v)		
Amortiguador de gel [Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	2.5 mL	—
Amortiguador de gel [Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	—	2.5 mL
SDS 10% (p/v)	0.1 mL	0.1 mL
Agua	6.1 mL	3.2 mL
Persulfato de amonio 10% (p/v)	120 µL	50 µL
TEMED	30 µL	30 µL

metanol y 10 % de ácido acético. El gel se destiñó con una solución de metanol-ácido acético-agua (40:10:50 v/v) por 3 h y las imágenes de los geles se obtuvieron con un sistema de fotodocumentación XRS (BioRad). El contenido de cada una de las proteínas en las diferentes subfracciones se estimó densitométricamente por medio del programa Quantity One (BioRad), para lo cual se seleccionó la misma área/volumen en cada una de las subfracciones, tomando como referencia la de mayor intensidad y volumen.

2 Contenido y propiedades fisicoquímicas del almidón

a Determinación de almidón total

El contenido de almidón total se determinó con el kit de análisis de almidón total K-TSTA (Megazyme, Irlanda). Se pesaron 100 mg de harina a la cual se le agregaron 5 mL de etanol al 80 % y se incubó durante 5 min a 80-85 °C. Posteriormente la pastilla se lavó dos veces con 5 mL de etanol al 80 % para eliminar maltodextrinas. La muestra libre de maltodextrinas se colocó en agitación por 20 min a 4 °C en presencia de KOH 2 M con la finalidad de disolver el almidón resistente, seguido de neutralización con amortiguador de acetato de sodio (1.2 M, pH 3.8). Se adicionaron 100 µL de α -amilasa y 100 µL de amilogucosidasa. Se incubó a 50 °C durante 30 min, posteriormente se aforó a 100 mL con agua destilada. Se tomó una alícuota de 10 mL y se centrifugó a 1,600 g por 10 min, del sobrenadante se tomaron 100 µL de muestra por duplicado y se adicionaron 3 mL de Glucosa oxidasa peroxidasa (GOPOD) para una posterior incubación durante 20 min a 50 °C. Para la obtención del blanco se tomaron 100 µL de agua desionizada estéril y por último, se agregaron 3 mL de GOPOD; de igual manera se realizó para la obtención del estándar de

glucosa. Transcurrido el tiempo de incubación se midió la absorbancia de las muestras a 510 nm. El porcentaje de almidón se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{Almidón} = \Delta A \times F \times D \times 1.8$$

Dónde:

ΔA = Absorbancia de la reacción

F = 100 μg de D-glucosa/ abs para 100 μg de D-glucosa

D = Factor de dilución

b Aislamiento de gránulos de almidón

Los gránulos de almidón se aislaron de granos de garbanzo de acuerdo a lo reportado por Grimaud y col (2008) con algunas modificaciones. A los granos de garbanzo se les retiró el germen y la testa de manera manual, se remojaron en una solución de metabisulfito de sodio 0.3 % (p/v) y ácido láctico al 85 % (v/v) pH 3.8 durante 48 h a 50 °C. Los cotiledones fueron homogeneizados con un amortiguador de extracción de almidón [Tris-HCl 50 mM (pH 7), glicerol 10 % (v/v), EDTA 10 mM, DTT 1.25 mM] a 4 °C, se maceraron en un mortero con la ayuda de un pistilo y se pasaron a través de un filtro de 100 μm , seguido de una centrifugaron a 13,000 g por 15 min. El almidón obtenido se lavó cinco veces con amortiguador de extracción, etanol al 95 % y acetona fría, y posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente durante 12 h.

c Determinación de amilosa/amilopectina

1) Pretratamiento del almidón

La determinación de amilosa y amilopectina se realizó con el kit K-AMYL 04/06 para amilosa/amilopectina (Megazyme, Irlanda). Un total de 25 mg de harina se trataron con 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), se mezclaron con un vórtex a baja velocidad y se calentaron en agua en ebullición durante 1 min. El tubo se mezcló vigorosamente y se volvió a colocar en agua en ebullición por 15 min con agitación intermitente. Una vez retirado el tubo se dejó en reposo por 5 min y se le agregaron 2 mL de etanol al 95 % con agitación continua en vórtex. Se agregaron otros 4 mL de etanol y se mezclaron por inversión formando un precipitado, se dejó reposar toda la noche. Las muestras se centrifugaron a 2,000 g por 5 min y el precipitado se secó por 10 min hasta asegurarse que todo el etanol se evaporó. Posteriormente al precipitado se le agregaron 2 mL de DMSO, y se colocó en baño maría por 15 min con mezclado intermitente. Al retirar las muestras, inmediatamente se agregaron 4 mL del solvente con Concanavalina A (Con A), se mezcló vigorosamente y se vació el contenido en matraces volumétricos (25 mL) con lavados constantes con solvente de Con A hasta aforar (solución A).

2) Precipitación de amilopectina y determinación de amilosa

Se tomó 1 mL de la solución A y se colocó en un tubo de 2 mL [Simultáneamente se realizó la determinación de almidón (Paso 3)], se agregaron 0.5 mL de la solución de Con A y se mezcló por inversión evitando formar espuma. El tubo se dejó reposar por 1 h, posteriormente se centrifugó (14,000 g, 10 min) a temperatura ambiente. Se transfirió 1 mL del sobrenadante a un tubo de 15 mL y se agregaron 3 mL de buffer

de acetato de sodio 100 mM, se mezcló y calentó por 5 min en agua en ebullición. El tubo se colocó en baño maría a 40 °C por 5 min, se le añadieron 0.1 mL de las enzimas α -amilasa/amiloglucosidasa y la muestra se mezcló e incubó por 30 min a 40 °C, seguido de centrifugación por 5 min a 2,000 g. Se pasó un 1 mL del sobrenadante a un tubo de vidrio y se le añadieron 4 mL de glucosa oxidasa/peroxidasa, se incubó por 20 min a 40 °C, incluyendo un blanco y el estándar de Glucosa. La absorbancia de las muestras y del estándar se midió a 510 nm.

3) Determinación de almidón

Se colocaron 0.5 mL de la solución A en un tubo de 15 mL, se agregaron 3 mL de buffer de acetato de sodio 100 mM, se mezcló y se añadieron 0.1 mL de las enzimas α -amilasa/amiloglucosidasa, seguido de un mezclado e incubación por 10 min a 40 °C. Posteriormente se tomó una alícuota de un mL y se le agregaron 4 mL de glucosa oxidasa/peroxidasa. Finalmente, se incubaron (junto con las muestras de amilosa) por 20 min a 40 °C. La absorbancia de las muestras se midió a 510 nm. El porcentaje de amilosa se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$Amilosa (\%) = \left(\frac{\Delta_{amilosa}}{\Delta_{almidón}} \right) \times \left(\frac{D1}{D2} \right) \times (100)$$

Dónde:

$\Delta_{amilosa}$ = Absorbancia de la alícuota para amilosa

$\Delta_{almidón}$ = Absorbancia de la alícuota para almidón total

D1 = Factor de dilución de la alícuota de amilosa

D2 = Factor de dilución de la alícuota de almidón

d Determinación del grado de hinchamiento

Se determinó de acuerdo al método descrito por Konik-Rose y col (2001). Se pesaron 40 mg de almidón tomando en cuenta la humedad para la obtención del peso seco (S), se colocó en un tubo de 1.5 mL y se mezcló con 1 mL de agua, se agitó vigorosamente y se incubó en un termomezclador Compact por 30 min a 92.5 °C con agitaciones suaves por inversión (20 veces/1 min y 2 veces por periodos de 1.5, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 15 y 25 min). La muestra se colocó en un baño de agua por 3 min a 20 °C para bajar la temperatura, realizando dos agitaciones suaves al tiempo cero y después de 1.5 min. La muestra se centrifugó a 17,000 g por 10 min en una centrífuga 5417 C (Eppendorf AG, Hamburg, Alemania), se retiró completamente el sobrenadante y se pesó la pastilla obtenida (B). El grado de hinchamiento se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Grado de hinchamiento} = \frac{\text{peso de la pastilla (B)}}{\text{peso seco de la muestra (S)}}$$

e Propiedades térmicas del almidón

Las propiedades de gelatinización y retrogradación del almidón se determinaron en un calorímetro diferencial de barrido modelo DSC-2920 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA) previamente calibrado con indio, utilizando una charola de aluminio vacía como referencia. Se pesaron 3.5 mg de muestra de almidón en una charola de aluminio y se le adicionaron 8.16 µL de agua destilada, se dejó en reposo durante 15 minutos, posteriormente se selló herméticamente y se dejó en reposar por 16 horas. La muestra de almidón se sometió a calentamiento en un intervalo de temperatura de

30 hasta 120 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Para el análisis de retrogradación, las muestras gelatinizadas se almacenaron a 4 °C por 7 días y de nuevo se sometieron a calentamiento bajo las mismas condiciones.

La temperatura pico de gelatinización (T_p), la entalpía de gelatinización (ΔH_g) y la entalpía de retrogradación (ΔH_r) se obtuvieron del análisis que se realizó con el programa TA Universal Analysis 2000 incluido con el equipo (TA Instruments, New Castle, DE, EUA). Los datos representan el promedio de tres réplicas.

El porcentaje de retrogradación se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Retrogradación} = \frac{\Delta H_r}{\Delta H_g} \times 100$$

3 Caracterización fitoquímica

a Cuantificación de carotenoides totales

Se realizó de acuerdo con lo descrito por Kimura y Rodríguez-Amaya (2004). Se pesaron 1.5 g de harina de garbanzo, la cual se rehidrató con 5 mL de agua desionizada y se dejó en un agitador de balanceo (Vari-Mix) por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 10 mL de acetona fría y la mezcla se homogeneizó en un Vari-Mix por 15 min. El homogeneizado se filtró a través de papel Whatman #40 con ayuda de una bomba de vacío y se recolectó el extracto. La harina se extrajo de nuevo con 25 mL de acetona fría (-20 °C) macerando en un mortero y pistilo, seguido de una filtración con vacío y recolectando el filtrado. Este procedimiento de molienda y filtrado se repitió al menos dos veces o hasta que el residuo no presentó coloración. Se agregaron 10 mL de éter de petróleo a una tercera parte del volumen recuperado en el proceso de extracción. Se

añadieron lentamente 150 mL de agua destilada, evitando agitar la mezcla para prevenir la formación de una emulsión. Se dejó reposar la mezcla durante 15 min para separar las fases y se descartó la acuosa. Este proceso se repitió dos veces más, tomando en cada ocasión la tercera parte del extracto recuperado en el filtrado. Una vez completada la separación de fases se tomó una alícuota de 10 mL y se filtró en presencia de sulfato de sodio. Posteriormente, se procedió a leer la absorbancia de ese extracto a 450 nm.

El contenido de carotenoides se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Carotenoides Totales } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{(A_{\text{total}})(\text{Volumen total en mL})(10^4)}{(A_{1\% / 1\text{cm}})(\text{Peso de la muestra en g})}$$

Donde:

A_{total} = Absorbancia medida

Volumen total = Volumen total del extracto (10 mL)

$A_{1\% / 1\text{cm}}$ = Coeficiente de absorción de carotenoides en éter de petróleo en una celda de 1 cm (2500).

b Perfil de carotenoides

El perfil de carotenoides se determinó utilizando las condiciones descritas previamente por Abbo y col (2005) con algunas modificaciones. Una muestra de 250 mg de harina se mezcló con 5 mL de acetona fría y se extrajo por sonicación durante 5 min (Sonicador FS30H, Fisher Scientific, USA); posteriormente se centrifugó a 10,000 g por 5 min, se recuperó el sobrenadante y se secó en un rotavapor, seguido de su resuspensión en 250 uL de acetona. La muestra se pasó por un filtro de jeringa

de 0.45 μm (PVDF membrane HPLC certified, Pall, USA) y se analizó en un equipo de HPLC modelo 1100 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Se inyectaron 20 μL de muestra para su separación en una columna YMC carotenoid (250 mm x 4.6 mm x 5 μm) a temperatura de 30 °C. La fase móvil consistió de terbutilmetiléter (15 %), metanol (81 %) y agua (4 %). En la separación se aplicó un flujo de 0.7 mL/min y un gradiente para alcanzar 77.5 % de metilbutiléter, 18.5 % de metanol y 4 % de agua, con un tiempo de corrida de 45 min. La detección se realizó con un detector de arreglo de diodos a 447 nm. Los carotenoides se cuantificaron a partir de curvas de calibración construidas con estándares comerciales (Luteína, zeaxantina, β -caroteno).

c Preparación de extractos metanólicos

Los extractos metanólicos utilizados para la determinación de compuestos fenólicos totales y el perfil de compuestos fenólicos se obtuvieron siguiendo la metodología de Sreerama y col (2010) con ligeras modificaciones. Se pesaron 0.5 g de harina y se mezcló con 15 mL de metanol al 80 % (v/v), la mezcla se homogeneizó por 30 minutos en un agitador orbital y de ahí se sonicó por 30 min. Al extracto sonicado se le realizó una hidrólisis ácida con 6 ml de HCl 2M. Posteriormente se sometió a calentamiento en baño María por 30 min. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 3,214 g por 10 min. El sobrenadante se mezcló con 10 mL de hexano. Una vez separadas las dos fases, se recuperó la fase acuosa y se mezcló con 10 mL de acetato de etilo. Se recuperó la fase de acetato de etilo y se llevó a sequedad en un rotavapor. El residuo seco se resuspendió en 300 mL de

metanol y se pasó por un filtro de 0.45 μm (PVDF membrane HPLC certified, Pall, USA). Los extractos de almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis.

d Compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó mediante el método colorimétrico descrito por Singleton y col (1999). Primeramente se oxidaron 20 μL del extracto metanólico con 180 μL del reactivo Folin-Ciocalteu. Luego de 3 min de reposo, se adicionaron 50 μL de una solución de carbonato de sodio al 7% y se incubaron por 90 min. Se midió la absorbancia a 750 nm utilizando un lector de microplacas (SynergyTM HT Multidetecion, Biotek, Inc., Winooski, VT). Para la cuantificación se preparó una curva utilizando ácido gálico como estándar. El contenido de fenólicos totales se expresó como mg equivalentes de ácido gálico (mg GAE) por 100 g de muestra en base seca (bs).

e Perfil de compuestos fenólicos

Para determinar el perfil de compuestos fenólicos se analizaron 5 μL del extracto metanólico con un equipo de HPLC-DAD ACCELA (Thermo Fisher Scientific, Inc, Whaltman, USA). La separación se realizó en una columna FORTIS C18 (50 x 2.1 mm) (Fortis Technologies LTD., Cheshire, Inglaterra). La fase móvil consistió de agua-ácido fórmico al 1 % (A) y acetonitrilo (B) inyectándose al HPLC con una velocidad de flujo de 0.2 mL/min; se utilizó un gradiente lineal iniciando con 95.5 % de A al minuto 0 hasta un 40 % al min 40, finalmente la columna fue reequilibrada con 100 % de A durante 5 min. El tiempo total de corrida fue de 50 minutos. La detección se realizó a 280, 320 y 350 nm. La identificación de compuestos fenólicos

en la muestra se realizó por comparación de los tiempos de retención y espectros de los picos cromatográficos con los de estándares (ácido gálico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido siríngico, catequina, miricetina, quercetina, genisteína y kaempferol).

4 Análisis genético

a Extracción de ADN

La extracción de ADN de 75 muestras (5 plantas por genotipo) se realizó utilizando el método micropreparatorio (micro-prep) descrito por Cingilli y Akçin (2005) con algunas modificaciones. Aproximadamente 0.2 g de tejido vegetativo previamente molido en nitrógeno líquido se incubaron con 1.5 mL de amortiguador de extracción [Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0; NaCl 1.0 M; EDTA 0.02 M; CTAB 2 % (p/v); PVP40 2 % (p/v); β -mercaptoetanol 0.4%] y 0.3 ml de sarcosil 5% a 65°C por 1 h; posteriormente se agregaron 1.5 mL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1, v/v). Después de un periodo de agitación de 5 min (varimix) se centrifugó a 424 g a 4 °C por 10 min. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo, se agregaron 1.5 mL de etanol frío y se colocaron a -20 °C toda la noche para facilitar la precipitación del ADN. El ADN precipitado se recuperó por centrifugación (424 g, 10 min, 4 °C), se lavó la pastilla con etanol al 75 % durante 20 min con agitación (varimix), se centrifugó de nuevo y la pastilla de ADN se secó a temperatura ambiente. Una vez seca, se resuspendió en 0.5 ml de amortiguador TE [Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0; EDTA 0.01 M] y se incubó a 60 °C por 20 min. Posteriormente el ADN se precipitó con 0.5 mL de isopropanol frío y 0.1 mL de acetato de sodio 3 M, se recuperó por centrifugación

(424 g, 10 min), se lavó con 0.5 mL de etanol al 70 %, se centrifugó de nuevo, se secó la pastilla de ADN y finalmente se resuspendió de nuevo en amortiguador TE.

b Obtención de microsatélites

Se utilizaron las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para maíz descritas por Pineda-Hidalgo y col (2011). La mezcla de reacción consistió de 1 μ L de ADN (50 ng/ μ L), 1.5 μ L de amortiguador de PCR 10X (200 mM Tris-HCl [pH 8.4], 500 mM KCl), 0.6 μ L de dNTP 2.5 mM, 0.6 μ L de $MgCl_2$ 50 mM, 1 U de Taq ADN polimerasa, 0.25 μ L de iniciadores 25 μ M y agua estéril para un volumen final de 15 μ L. Se empleó un termociclador C1000 touch (BiO-RAD, CA, USA) él cual fue programado con un periodo inicial de 5 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, temperatura óptima para los microsatélites y 1.5 min a 72 °C, con un período final de 5 min a 72 °C. En el Cuadro 8 se muestran las características de los 30 microsatélites utilizados.

La separación de los fragmentos amplificados se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15 % (p/v) bajo condiciones no desnaturalizantes con amortiguador TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM). Se utilizó un gel concentrador al 4 %. La corrida se realizó en una unidad electroforética vertical MP3 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y una fuente de poder EC600-90 (Thermo EC, Waltham, MA, USA). Se empleó como marcador de tamaño molecular una escalera de 50 pb (GE Healthcare, Piscataway, NY, USA). Los 15 μ L de la reacción de PCR se mezclaron con 3 μ L de amortiguador de carga 6x [azul de bromofenol 0.25 % (p/v), sacarosa 30 % (p/v)] (Sambrook y Russell, 2001) y posteriormente se cargaron en los pozos del gel. La separación electroforética se realizó a voltaje constante (100

Cuadro 8. Características de los marcadores microsatelites utilizados.

Nombre	Ubicación	Secuencia repetida	Secuencia de los iniciadores
CaSTMS2 ^a	LG4	(TAT)25	D: ATTTTACTTTACTACTTTTTTCCTTTC R: AATAAATGGAGTGTAATTTTCATGTA
CaSTMS15 ^a	LG6	(ATT)21	D: CTTGTGAATTCATATTTACTTATAGAT R: TCCGTAATTTAAGGTAGGTTAAAATA
CaSTMS21 ^{ac}	LG1	(CT)9n(CTTT)2 (CT)4	D: CTACAGTCTTTTGTCTTCTAGCTT R: ATATTTTTTAAGAGGCTTTTGGTAG
NCPGR6 ^b	-	(CA)12	D: GACCAAGATTAGTAGAACCT R: TATGTCTACACCTATGCATC
NCPGR7 ^b	-	(CA)14	D: GACCAAGATTAGTAGAACCT R: CTTGATAAGGATGAGTCATG
NCPGR12 ^b	-	(CT)35	D: CCTTGTTAGTGTGTATAGGT R: GTAATGACCAAGTGAACA
NCPGR19 ^b	-	(GA)19	D: TCCATTGTAGCTTAGCTTAG R: TCTTACTCTTAGCTTACCTCTT
TA14 ^{c,d}	LG6	(TAA)22n(TAA)4 T(A)3n(AAT)5n (A)3n(GA)4(TA A)5	D: TGACTTGCTATTTAGGGAACA R: TGGCTAAAGACAATTAAGTT
TA21 ^{c,d}	LG7	(TAA)51	D: GTACCTCGAAGATGTAGCCGATA R: TTTTCCATTTAGAGTAGGATCTTCTTG
TA22 ^{c,d}	LG6	(ATT)40	D: TCTCCAACCCTTTAGATTGA R: TCGTGTTTACTGAATGTGGA

D: Directo (5'-3'); R: Reverso (3'-5'). LG: grupo de ligamiento (del inglés linkage group).

^a Hüttel y col (1999); ^b Sethy y col (2003); ^c Winter y col (1999); ^d Millan y col (2010).

Cuadro 8. Continuación

Nombre	Ubicación	Secuencia repetida	Secuencia de los iniciadores
TA27 ^{c,d}	LG2	(TAA)21	D: GATAAAATCATTATTGGGTGTCCTTT R: TTCAAATAATCTTTCATCAGTCAAATG
TA46 ^{c,d}	LG4	(TAA)22	D: TTTATTGCAATAAAACTCATTTCTTATC R: TTCTTTTTGTGTGAAAAAAAAAATATAGTGA
TA64 ^{c,d}	LG3	(TAA)39	D: ATATATCGTAACTCATTAATCATCCGC R: AAATTGTTGTCATCAAATGGAAAATA
TA71 ^{c,d}	LG5	(AAT)32	D: CGATTTAACACAAAACACAAA R: CCTATCCATTGTCATCTCGT
TA72 ^{c,d}	LG4	(ATT)36	D: GAAAGATTTAAAAGATTTTCCACGTTA R: TTAGAAGCATATTGTTGGGATAAGAGT
TA113 ^{c,d}	LG 1	(TAA)26	D: TCTGCAAAAACACTATTACGTTAATACCA R: TTGTGTGTAATGGATTGAGTATCTCTT
TA118 ^{c,d}	LG8	(TAA)45	D: ACAAGTCACATGTGTTCTCAATA R: GGAAAGGTTAAGAAATTTTACAATAC
TA130 ^{c,d}	LG4	(TAA)19	D: TCTTTCTTTGCTTCCAATGT R: GTAAATCCCACGAGAAATCAA
TA135 ^{c,d}	LG3	(TAA)17	D: TGGTTGGAAATTGATGTTTT R: GTGGTGTGAGCATAATTCAA
TA200 ^{c,d}	LG2	(TTA)37	D: TTTCTCCTCTACTATTATGATCACCAG R: TTGAGAGGGTTAGAACTCATTATGTTT

D: Directo (5'-3'); R: Reverso (3'-5'). LG: grupo de ligamiento (del inglés linkage group).

^a Hüttel y col (1999); ^b Sethy y col (2003); ^c Winter y col (1999); ^d Millan y col (2010).

Cuadro 8. Continuación

Nombre	Ubicación	Secuencia repetida	Secuencia de los iniciadores
TA206 ^c	-	(TAA)25	D: GTCCCACTTCCACTTATAAAGGTT R: TAACGTATCTTGCAGATTTCAAATAAA
TA76s ^c	LG1	(AAT)7(AAT)4[ACT AAT)11]2n(AAT)3n (AAT)2(ATT)5	D: TCCTCTTCTTCGATATCATCA R: CCATTCTATCTTTGGTGCTT
TAA58 ^{c,d}	LG7	(AAT)41	D: CATTGCTTAAGAACCAAATGG R: CAATTTTACATCGACGTGTGC
TaaSH ^{c,d}	LG5	(TAA)40	D: GGTAGACGCAAAGAGTGGG R:GCCACATTGACCAGGAATG
TR2 ^{c,d}	LG3	(TTA)36	D: GGCTTAGAGTTCAAAGAGAGAA R:AACCAAGATTGGAAGTTGTG
TR7 ^{c,d}	LG6	(TTA)25	D: GCATTATTCACCATTTGGAT R: TGTGATAATTTTCTAAGTGTTTT
TR29 ^{c,d}	LG5	(TAA)8n(TAA)32	D: GCCCACTGAAAAATAAAAAG R: ATTTGAACCTCAAGTTCTCG
TR31 ^{c,d}	LG3	(TAA)20 n(A)5 (TAA)9	D: CTTAATCGCACATTTACTCTAAAATCA R: ATCCATTAAAACACGGTTACCTATAAT
TR43 ^{c,d}	LG1	(TAA)24	D: AGGACGAAACTATTCAAGGTAAGTAGA R: AATTGAGATGGTATTAATGGATAACG
TS84 ^c	-	(TTA)25	D: TTATAACAGCTTCCTTCTATTTGTTTTG R: AAGGCAAAGTTTTTATCCCTTAATAG

D: Directo (5'-3'); R: Reverso (3'-5'). LG: grupo de ligamiento (del inglés linkage group).

^a Hüttel y col (1999); ^b Sethy y col (2003); ^c Winter y col (1999); ^d Millan y col (2010).

V) durante aproximadamente 3 h. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0.01 µg/mL) y los productos se digitalizaron en presencia de luz ultravioleta con un fotodocumentador Chemidoc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), utilizando el programa QuantityOne (Bio-Rad) para la adquisición y análisis de las imágenes.

5 Análisis de asociación

El mapeo por asociación se realizó con el programa PowerMarker versión 3.25 (Liu y Muse 2005). Se utilizó un análisis de varianza donde el factor fue el marcador en cuestión y los niveles del mismo (tratamientos) los genotipos que presentó el marcador en la población de estudio. Como ejemplo, si un marcador presentó solo dos alelos (A_1 y A_2), existieron tres posibles genotipos (A_1A_1 , A_1A_2 , A_2A_2), por lo tanto tres niveles del factor o tratamientos. Del total de individuos u observaciones de la característica en cuestión, un cierto número correspondió a cada tratamiento o genotipo. A partir de esta información, se realizó una prueba F donde la hipótesis nula (H_0) se refirió a que no existe asociación significativa entre el marcador y la característica de interés, estableciendo como criterio un valor de $p \leq 0.05$ para rechazar la hipótesis y por lo tanto, asumir que si existe la asociación.

6 Análisis estadístico

Para el análisis de las características nutrimentales y nutracéuticas se utilizó un diseño unifactorial, cuyo factor fueron los diferentes genotipos evaluados. El análisis de varianza se acompañó de una prueba de comparación de medias por el método de Fisher con un nivel de significancia del 5 %. Para todos los análisis se utilizó el programa Statgraphics Plus 5.1 (StatPointTechnologies, Inc., Warrenton VA, EUA).

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A CONTENIDO Y PERFIL DE LAS PRINCIPALES PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO DEL GRANO EN LOS GENOTIPOS DE GARBANZO

1 Contenido de proteína total

El garbanzo ha sido reconocido como una fuente económica de proteínas vegetales en la dieta humana de numerosos países en desarrollo debido a su alta biodisponibilidad y alto valor biológico (Dhawan y col 1991). En el Cuadro 9 se muestra el contenido de proteína total de los 15 genotipos analizados en el presente estudio, donde se puede observar una amplia variación en esta característica, con un rango de valores de 14.5 a 22.9 g proteína /g muestra (bs) para los genotipos Blanoro e ICC 3421, respectivamente. El análisis estadístico reveló diferencias significativas en el contenido de proteína entre los genotipos, pero no entre los valores promedio de cada tipo, el cual fue de 19.8 g proteína /g muestra para los genotipos tipo desi y tipo kabuli. Este valor es similar al promedio de 20.4 g proteína /g muestra reportado por Singh y col (2008b) para 3 genotipos de garbanzo tipo desi y 2 tipo kabuli de la India. Asimismo, los valores encontrados en los 15 materiales del presente estudio caen dentro del rango de 13.3 a 26.8 g de proteína /g de muestra reportado por Jadhav y col (2015) en 187 genotipos representativos de la diversidad de garbanzos tipo desi y kabuli. Cabe destacar que la variabilidad en contenido de proteína encontrada en el presente estudio representa el 62 % de la observada por estos autores, a pesar de que el número de genotipos corresponde solamente al 8 %, lo que sugiere una amplia base genética de los materiales de garbanzo utilizados con potencial de uso en el mejoramiento de esta característica.

Cuadro 9. Contenido de proteína en los genotipos de garbanzo estudiados.

Genotipo	Proteína (g/100 g harina, bs)
Desi	
ICC 5613	19.1 ^{ef}
ICC 6303	21.8 ^{bc}
ICC 5383	18.6 ^f
ICC 4418	19.1 ^{ef}
ICC 3761	20.1 ^d
ICC 14872	15.1 ^h
ICC 13124	16.7 ^g
ICC 3512	19.0 ^{ef}
ICC 3421	22.9 ^a
Promedio	19.8^a
Kabuli	
Bco. Sin. 92	21.2 ^c
Jumbo 2010	18.7 ^f
Blanoro	14.5 ⁱ
Progreso 95	18.7 ^f
Hoga 340	19.6 ^{de}
Hoga 021	22.2 ^{ab}
Promedio	19.8^a

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Fisher. Letras diferentes para los valores promedio indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre garbanzos tipo desi y kabuli de acuerdo con una prueba t.

2 Perfil de las principales fracciones de proteínas

a Globulinas

En la Figura 4 se muestra la separación por SDS-PAGE de la fracción de globulinas extraída de 0.5 mg de harina en los 15 genotipos de garbanzo. El análisis del perfil obtenido permitió identificar 7 bandas como proteínas del tipo vicilina 7S y leguminas 11S subunidades α y β . Los pesos moleculares encontrados en este estudio para las fracciones de vicilina 7S (49.6, 34.3, 17.5 kDa) fueron similares a los reportados para las proteínas 7S de chícharo (50, 35, 19 kDa) por Guéguen (1991). Sathe y col (1987) identificaron una vicilina 7S (78 kDa) similar a la vicilina 7S de 71.4 kDa encontrada en este estudio.

Sánchez-Vioque y col (1999) identificaron en garbanzo una legumina 11S (39 kDa) que correspondió con una glicinina 11S de soya (42 kDa). En todos los genotipos evaluados en el presente trabajo fue posible identificar dos bandas para la proteína legumina 11S subunidad α , una de 40 kDa y otra que presentó dos isoformas (36 y 37 kDa); los genotipos tipo kabuli solo presentaron la isoforma de 37 kDa, mientras que los tipo desi presentaron ambas isoformas. El hecho de que la isoforma de 36 kDa solo se encontró en algunos genotipos tipo desi sugiere la posibilidad de utilizarla como marcador para diferenciar estos genotipos de garbanzo. Interesantemente, dos de los genotipos tipo desi (ICC 6306 y ICC 3421) que presentaron la isoforma de 37 kDa se agruparon con los genotipos kabuli en un análisis de agrupamiento de proteínas realizado por Guerrero-Soto (2014), lo que sugiere la posibilidad de que estos genotipos tengan un ancestro en común del cual heredaron esta isoforma.

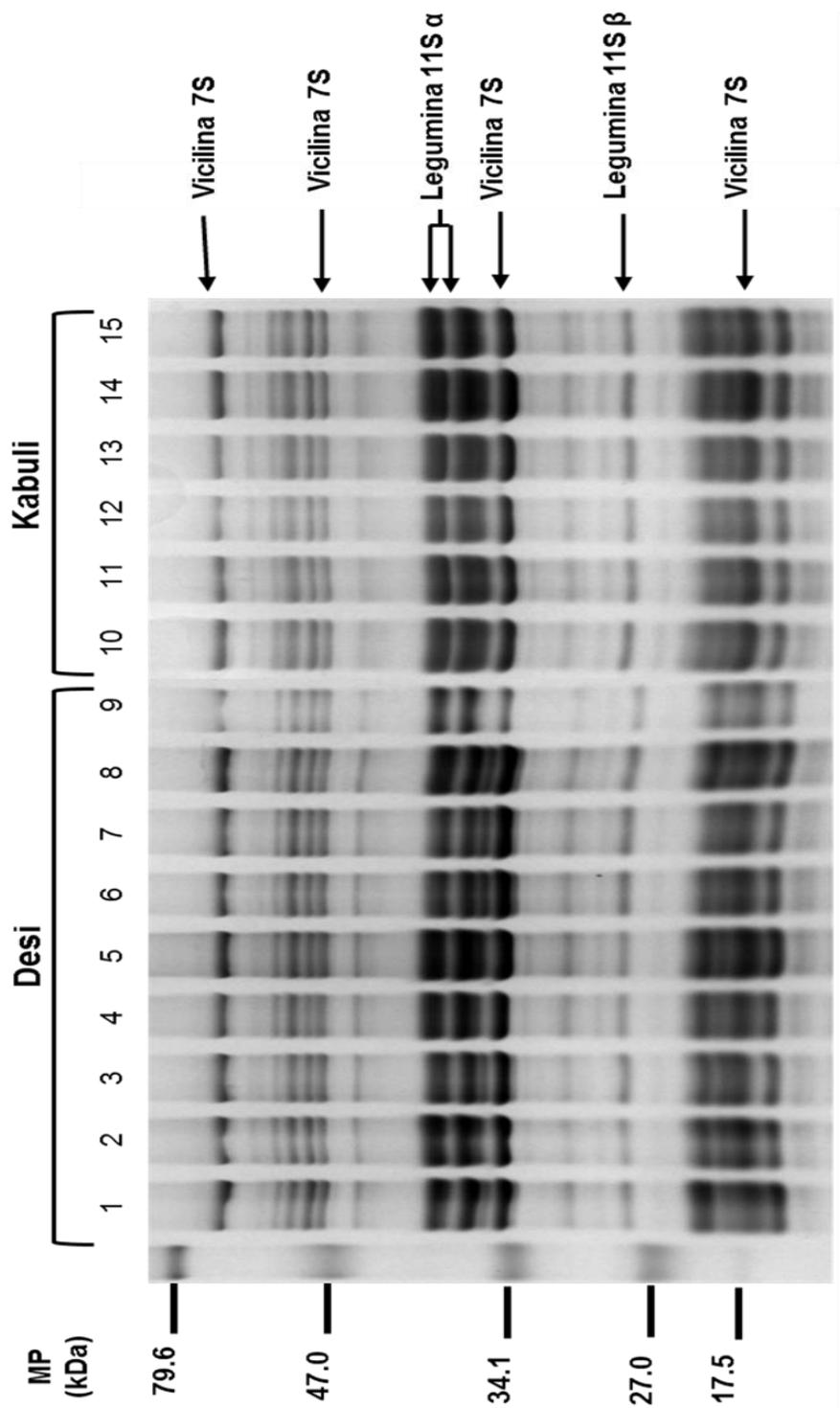


Figura 4. Separación por SDS-PAGE de la fracción globulinas de garbanzo. A la izquierda se muestran los tamaños de los marcadores de peso molecular (kDa). Carriles: 1, ICC 5613; 2, ICC 6306; 3, ICC 5383; 4, ICC 4418; 5, ICC 3761; 6, ICC 14872; 7, ICC 13124; 8, ICC 3512; 9, ICC 3421; 10, Bco. Sin. 92; 11, Jumbo 2010; 12, Blanoro; 13, Progreso 95; 14, Hoga 340-2; 15, Hoga 021

En el Cuadro 10 se muestran los resultados de la cuantificación densitométrica de cada una de las proteínas identificadas en la fracción de globulinas. Se encontraron diferencias significativas en la acumulación de todas las proteínas entre los genotipos, donde en algunos casos como se mencionó anteriormente se encontraron diferencias cualitativas, tal es el caso de las isoformas de 36 y 37 kDa de la legumina 11S subunidad α . En general se encontró una mayor acumulación de las tres isoformas de la legumina 11S subunidad α y de las isoformas de bajo peso molecular de la vicilina 7S (17.5 y 34.8 kDa). La variabilidad observada en la acumulación de estas proteínas sugiere la posibilidad de realizar un análisis de asociación con la variación alélica de marcadores moleculares.

b Albúminas

En la Figura 5 se muestra la separación por SDS-PAGE de la fracción de albúminas extraída de 0.5 mg de harina en los 15 genotipos de garbanzo. Se pudieron identificar bandas de proteínas que van desde 25.6 hasta 96 kDa, correspondientes a las proteínas albúmina 2S y lipoxigenasa, respectivamente. Estas dos proteínas fueron las albúminas más abundantes de acuerdo con el análisis densitométrico (Cuadro 11).

La lipoxigenasa (96 kDa) es una enzima involucrada en la degradación de ácidos grasos poliinsaturados; específicamente utiliza como sustrato a los ácidos linolénico y linoleico, jugando un papel clave en la regulación ya que el producto final de la vía oxidativa en la que participan origina el ácido jasmónico, responsable de la activación de genes durante la respuesta a daños en la planta (Baysal 2007).

Cuadro 10. Análisis densitométrico de la fracción de globulinas en los 15 genotipos de garbanzo evaluados.

Genotipo	Vicilina 7S (71.4 kDa)	Vicilina 7S (46 kDa)	Legumina 11S α (40 kDa)	Legumina 11S α (37 kDa)	Legumina 11S α (36 kDa)	Vicilina 7S (34.8 kDa)	Legumina 11S β (27.4 kDa)	Vicilina 7S (17.5 kDa)
Desi								
ICC 5613	1737 ^c	1741 ^b	2362 ^d	ND	2522 ^c	2381 ^g	1620 ^{fe}	2384 ^{d-g}
ICC 6306	1640 ^{cd}	1712 ^b	2386 ^d	2588 ^{bc}	ND	2388 ^{e-g}	1539 ^{gh}	2412 ^{c-f}
ICC 5383	1297 ^f	1450 ^c	1982 ^g	ND	2174 ^b	2128 ^h	1315 ⁱ	2024 ^b
ICC 4418	1458 ^{cd-f}	1674 ^b	2264 ^{ef}	2424 ^{cd}	ND	2389 ^{e-g}	1525 ^{gh}	2267 ^g
ICC 3761	2393 ^a	2007 ^a	2915 ^a	2934 ^a	ND	2972 ^b	1903 ^a	2821 ^a
ICC 14872	2093 ^b	1998 ^a	2679 ^{b-c}	ND	2677 ^a	2526 ^d	1777 ^{a-d}	2543 ^{b-d}
ICC 13124	1981 ^b	1938 ^a	2636 ^c	ND	2607 ^{ab}	2507 ^{de}	1744 ^{b-e}	2654 ^{ab}
ICC 3512	1458 ^{cd-f}	1674 ^b	2264 ^{ef}	2422 ^{cd}	ND	2972 ⁱ	1633 ^{efg}	2578 ^{bc}
ICC 3421	2157 ^b	1979 ^a	2743 ^{bc}	2874 ^a	ND	3102 ^a	1876 ^{ab}	2371 ^{d-g}
Promedio kabuli	1802^a	1797^a	2470^a	2648^a	2495	2531^a	1660^a	2450^a
Bco. Sin. 92	1681 ^{cd}	1685 ^b	2306 ^{ef}	2466 ^{b-d}	ND	2325 ^g	1564 ^{gh}	2328 ^{e-g}
Jumbo 2010	1584 ^{c-e}	1657 ^b	2330 ^{ef}	2532 ^{b-d}	ND	2331 ^g	1483 ^{gh}	2356 ^{e-g}
Blanoro	1241 ^f	1393 ^c	1926 ^g	2118 ^e	ND	2072 ^h	1259 ⁱ	1968 ^h
Progreso 95	1402 ^{ef}	1617 ^b	2208 ^f	2366 ^d	ND	2332 ^g	1469 ^h	2211 ^g
Hoga 340	2101 ^b	1950 ^a	2787 ^b	2878 ^a	ND	2816 ^c	1820 ^{a-c}	2765 ^a
Hoga 021	2037 ^b	1942 ^a	2623 ^c	2621 ^b	ND	2470 ^{d-f}	1721 ^{c-e}	2487 ^{b-e}
Promedio	1674^a	1707^a	2363^a	2497^a	ND	2391^a	1553^a	2353^a

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (P<0.05) entre las medias de acuerdo con la prueba de Fisher. Letras diferentes para los valores promedio indican diferencias significativas (P<0.05) entre garbanzos tipo desi y kabuli de acuerdo con una prueba t. ND: No detectada.

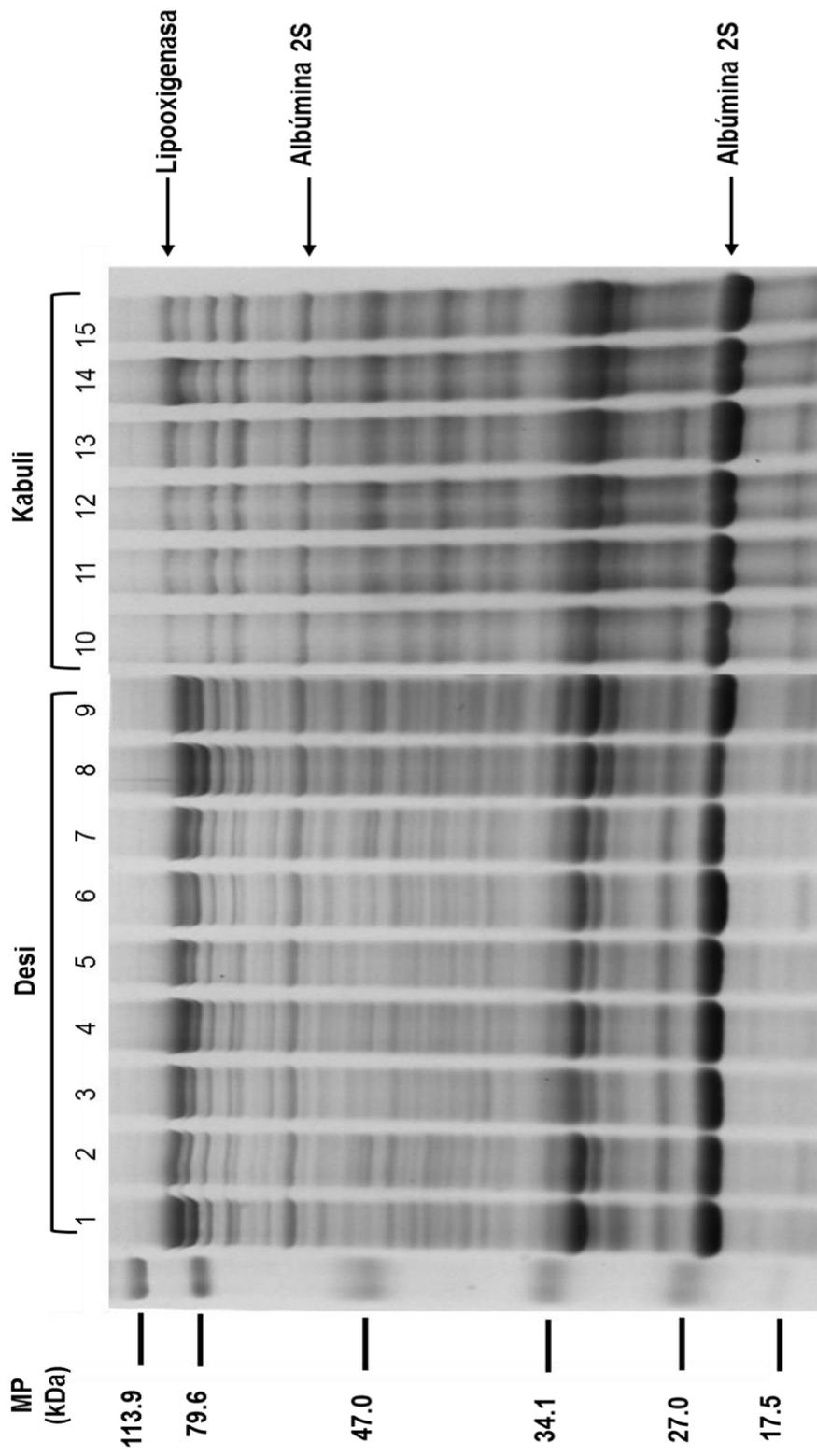


Figura 5. Separación por SDS-PAGE de la fracción albúminas de garbanzo. A la izquierda se muestran los tamaños de los marcadores de peso molecular (kDa). Carriles: 1, ICC 5613; 2, ICC 6306; 3, ICC 5383; 4, ICC 4418; 5, ICC 3761; 6, ICC 14872; 7, ICC 13124; 8, ICC 3512; 9, ICC 3421; 10, Bco. Sin. 92; 11, Jumbo 2010; 12, Blanco; 13, Progreso 95; 14, Hoga 340-2; 15, Hoga 021

Cuadro 11. Análisis densitométrico de la fracción de albúminas en los 15 genotipos de garbanzo evaluados.

Genotipo	Lipoxigenasa (96 kDa)	Albúmina 2S (66 kDa)	Albúmina 2S (25.6 kDa)
Desi			
ICC 5613	2574 ^a	1870 ^{ab}	2543 ^{cd}
ICC 6306	2340 ^{ab}	1722 ^{ab}	2697 ^{a-c}
ICC 5383	2083 ^{b-e}	1606 ^b	2670 ^{a-c}
ICC 4418	2226 ^{a-d}	1609 ^b	2726 ^{a-c}
ICC 3761	2041 ^{b-f}	1642 ^{ab}	2785 ^{ab}
ICC 14872	1943 ^{b-f}	1618 ^b	2809 ^a
ICC 13124	2032 ^{b-f}	1636 ^b	2728 ^{a-c}
ICC 3512	2112 ^{a-e}	1719 ^{ab}	2336 ^d
ICC 3421	2320 ^{a-c}	1975 ^a	2730 ^{a-c}
Promedio	2186^a	1711^a	2670^a
Kabuli			
Bco. Sin. 92	1569 ^f	1750 ^{ab}	2755 ^{a-c}
Jumbo 2010	1657 ^{ef}	1754 ^{ab}	2677 ^{a-c}
Blanoro	1784 ^{d-f}	1800 ^{ab}	2674 ^{a-c}
Progreso 95	1838 ^{c-f}	1785 ^{ab}	2812 ^a
Hoga 340	2140 ^{a-e}	1791 ^{ab}	2527 ^{cd}
Hoga 021	1768 ^{d-f}	1715 ^{ab}	2583 ^{a-d}
Promedio	1793^a	1765^a	26712^a

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Fisher. Letras diferentes para los valores promedio indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre garbanzos tipo desi y kabuli de acuerdo con una prueba t.

Esto coincide con el hecho de que los genotipos tipo desi fueron los que presentaron una mayor acumulación de lipoxigenasa, los cuales a su vez son los que generalmente presentan mayor resistencia a estrés como ataque de patógenos.

En el caso de la albúmina 2S se pudieron identificar dos bandas (25.6 y 66.1 kDa). La proteína de 25.6 kDa es similar a la albúmina PA2 reportada por Clemente y col (2000); esta proteína es del tipo lectina, cuya principal función es aglutinar los carbohidratos. Al igual que en otras leguminosas como el chícharo (Clemente y col 2000), esta albúmina fue la más abundante en los genotipos de garbanzo (Cuadro 11). En relación a la albúmina de 66 kDa, esta coincide con una proteína con actividad antifúngica reportada por Duan y col (2013) en garbanzo.

B PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL ALMIDÓN EN LOS GENOTIPOS DE GARBANZO ESTUDIADOS

1 Composición y grado de hinchamiento

a Almidón total

El contenido de almidón total mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los genotipos, con valores entre 37.3 y 53.0 g/100 g harina (Cuadro 12). El valor más pequeño lo presentó el genotipo tipo kabuli Hoga 021, mientras que el valor más alto se observó en el garbanzo tipo desi ICC4418. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los valores promedio de almidón de los genotipos desi y kabuli garbanzo (Cuadro 12). En lo general, el contenido de almidón de los genotipos se encontró dentro de los rangos reportados por otros autores para garbanzo.

Cuadro 12. Composición y grado de hinchamiento del almidón de los genotipos de garbanzo estudiados.

Genotipo	Almidón (g/100 g harina)	Amilosa (g/100 g almidón)	GH (g H₂O/g almidón)
Desi			
ICC5613	44.3 ^f	27.6 ^{bc}	6.6 ^f
ICC6306	47.2 ^{de}	22.9 ^{ef}	6.9 ^f
ICC5383	49.7 ^b	28.5 ^b	5.6 ^g
ICC4418	53.0 ^a	27.4 ^{bc}	5.1 ^g
ICC3761	44.9 ^f	31.4 ^a	5.4 ^g
ICC14872	42.2 ^g	22.2 ^f	8.0 ^e
ICC13124	37.9 ^j	26.6 ^c	8.3 ^{de}
ICC3512	39.0 ⁱ	27.5 ^{bc}	8.0 ^e
ICC3421	40.7 ^h	27.7 ^{bc}	7.2 ^f
Promedio	44.3^a	26.8^a	6.8^b
Kabuli			
Bco. Sin. 92	48.1 ^{cd}	26.8 ^c	8.6 ^{cd}
Jumbo 2010	46.2 ^e	22.1 ^f	9.5 ^{ab}
Blanoro	48.5 ^{bc}	22.3 ^f	9.8 ^a
Progreso 95	38.4 ^{ij}	20.4 ^g	9.4 ^{ab}
Hoga 340	44.9 ^f	25.1 ^d	8.3 ^{de}
Hoga 021	37.3 ^j	23.8 ^e	8.9 ^{bc}
Promedio	43.9^a	23.4^b	9.1^a

GH: Grado de hinchamiento.

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Fisher. Letras diferentes para los valores promedio indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre garbanzos tipo desi y kabuli de acuerdo con una prueba t.

Meares y col (2004) reportaron un contenido de almidón entre 40 y 46 % para genotipos tipo desi de Australia, mientras que Özer y col (2010) encontraron un rango de 41.8 a 49.1 % para genotipos tipo kabuli de Turquía.

b Contenido de amilosa

La variación en el contenido de amilosa de los 15 genotipos de garbanzo se muestra en el Cuadro 12. El rango de valores obtenido fue de 20.4 (Progreso 95) a 31.4 g/100 g almidón (ICC3761). En promedio los genotipos tipo desi presentaron un contenido de amilosa significativamente mayor que los del tipo kabuli. Estos valores coinciden con lo reportado previamente para garbanzo tipo desi de Australia por Meares y col (2004) (24-27%) y de la India por Singh y col (2004) (28.6 a 34.3%), así como el contenido promedio obtenido por Huang y col 2007 (27.2 %), para genotipos de China.

La amilosa es un componente importante ya que participa en la gelificación y retrogradación del almidón cuando éste es sometido a procesos de cocción y almacenamiento, por lo que garbanzos con bajo contenido de amilosa como Progreso 95 pudieran ser aptos para productos con textura más suave y mayor digestibilidad (Biliaderis 1991).

c Grado de hinchamiento

El grado de hinchamiento (GH) se utiliza frecuentemente como una medida indirecta de la adquisición de agua durante la gelatinización del almidón (Konik-Rose y col 2001). Los valores encontrados fluctuaron entre 5.1 y 9.8 g H₂O/g almidón, correspondientes a los genotipos ICC4418 y Blanoro, respectivamente (Cuadro 12).

En promedio, los almidones de los genotipos tipo kabuli presentaron un hinchamiento significativamente mayor que los de tipo desi. Estos valores son inferiores al rango de 11.4-13.6 g/g reportado por Singh y col (2004) en 5 genotipos de garbanzo tipo desi y un kabuli de la India, lo cual se puede atribuir a diferencias en la base genética y el método empleado en la determinación. No obstante, el rango de valores obtenido en el presente estudio sugiere una amplia variabilidad en las propiedades que dependen de este parámetro, como lo son las reológicas.

El hinchamiento de los gránulos de almidón está relacionado con la disrupción parcial de puentes de hidrógeno intra e intermoleculares y depende de muchos factores, dentro de los que destacan la composición y estructura del gránulo. El GH parece ser una propiedad principalmente asociada con la amilopectina; la presencia de regiones menos cristalinas en el gránulo por la distribución asimétrica de moléculas de amilopectina parece favorecer la entrada del agua y por lo tanto, el hinchamiento, mientras que la amilosa puede actuar como un diluyente o bien formar complejos con lípidos que inhiben este comportamiento (Tester y Morrison 1990). De acuerdo con esto, el GH y contenido de amilosa de los genotipos de garbanzo se correlacionaron inversamente ($r=-0.715$, $p<0.001$; Figura 6).

2 Propiedades térmicas

En el Cuadro 13 se presentan las propiedades de gelatinización y retrogradación del almidón de los genotipos de garbanzo. La mayor variación en la temperatura de gelatinización se observó en los garbanzos tipo desi, con un rango de 63.8 a 68.6 °C para los genotipos ICC5383 e ICC3512, respectivamente. En promedio, este parámetro fue ligeramente mayor en los garbanzos tipo desi que en los kabuli.

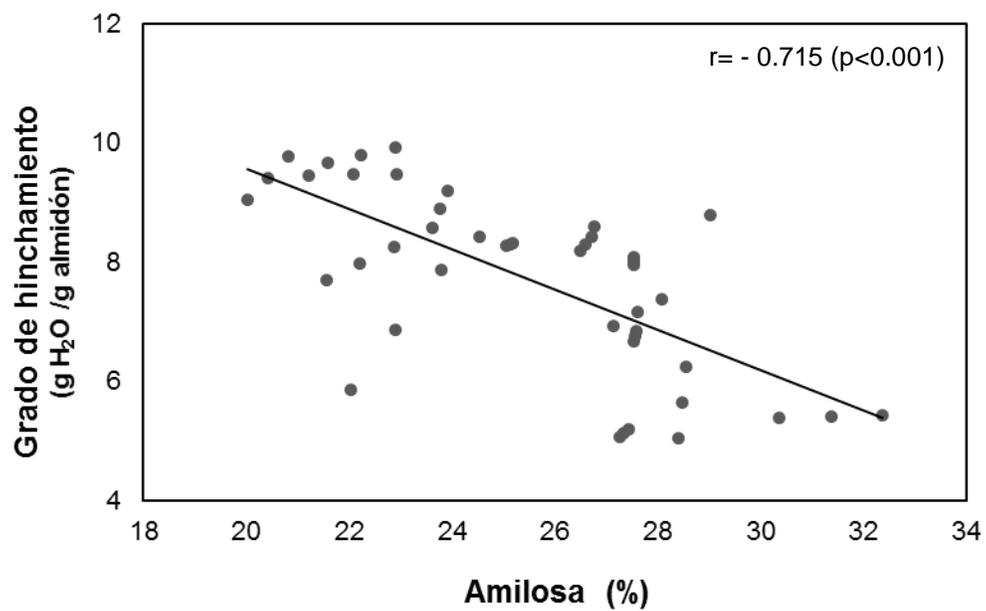


Figura 6. Correlación entre el grado de hinchamiento y el contenido de amilosa en 15 genotipos de garbanzo.

Cuadro 13. Propiedades de gelatinización y retrogradación del almidón de los genotipos de garbanzo estudiados.

Genotipo	T_pG (°C)	ΔH_G (J/g)	T_pR (°C)	ΔH_R(J/g)	%R
Desi					
ICC5613	65.6 ^{d-f}	6.9 ^g	51.7 ^{gh}	2.8 ^f	41.1 ^{e-g}
ICC6306	65.9 ^{cd}	9.3 ^c	54.8 ^{b-d}	3.6 ^d	38.8 ^{f-h}
ICC5383	63.8 ⁱ	7.9 ^{ef}	53.4 ^{c-g}	3.3 ^e	41.4 ^{e-g}
ICC4418	67.9 ^b	9.6 ^{bc}	54.1 ^{c-e}	4.7 ^a	49.0 ^b
ICC3761	66.3 ^c	6.2 ^h	50.7 ^h	3.2 ^e	59.5 ^a
ICC14872	65.3 ^{e-g}	11.4 ^a	53.9 ^{c-e}	4.0 ^{bc}	34.4 ^h
ICC13124	65.1 ^{fg}	11.2 ^a	51.3 ^{gh}	4.7 ^a	41.9 ^{e-g}
ICC3512	68.6 ^a	7.7 ^f	54.4 ^{b-e}	3.2 ^e	41.8 ^{e-g}
ICC3421	67.8 ^b	6.8 ^{gh}	54.9 ^{bc}	3.3 ^e	47.6 ^{bc}
Promedio	66.3^a	8.6^a	53.2^a	3.6^a	44.0^a
Kabuli					
Bco. Sin. 92	64.4 ^{hi}	10.1 ^b	56.4 ^a	3.8 ^{b-d}	37.6 ^{gh}
Jumbo 2010	65.2 ^{e-g}	8.2 ^{ef}	53.8 ^{c-f}	3.7 ^{cd}	44.6 ^{b-e}
Blanoro	65.8 ^{c-e}	8.4 ^e	55.4 ^{ab}	3.7 ^{b-d}	44.0 ^{c-e}
Progreso 95	64.7 ^{gh}	9.3 ^c	51.2 ^{f-h}	4.0 ^{bc}	43.5 ^{c-f}
Hoga 340	65.0 ^{f-h}	8.6 ^{de}	52.5 ^{e-h}	4.0 ^b	47.1 ^{b-d}
Hoga 021	65.1 ^{e-g}	9.1 ^{cd}	52.6 ^{d-h}	3.9 ^{b-d}	42.6 ^{d-f}
Promedio	65.0^b	9.0^a	53.7^a	3.8^a	43.2^a

T_pG: temperatura pico de gelatinización; ΔH_G: entalpía de gelatinización; T_pR: temperatura pico de retrogradación; ΔH_R: entalpía de retrogradación; %R: porcentaje de retrogradación. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (P<0.05) entre las medias de acuerdo con la prueba de Fisher. Letras diferentes para los valores promedio indican diferencias significativas (P<0.05) entre los garbanzos tipo desi y kabuli de acuerdo con una prueba t.

Singh y col (2004) y Hughes y col (2009) reportaron para diferentes genotipos de garbanzo rangos de temperatura de gelatinización de 66.4 a 69.0 °C y de 63.2 a 65.51 °C, respectivamente, los cuales corresponden con el encontrado en el presente estudio. Este parámetro es importante para determinar las variables de cocimiento de la harina de garbanzo y sus productos.

La entalpía de gelatinización (ΔHG) también se presentó diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los diferentes genotipos, con valores de 6.2 (ICC3761) a 11.4 J/g (ICC14872). Estos resultados son similares a los reportados por Singh y col (2010) en 17 genotipos desi y 3 kabuli de la India (6.6 - 11.5 J/g). Esta propiedad se ha utilizado como una medida general de cristalinidad (calidad y cantidad de los cristales) y como un indicador de la pérdida del orden molecular en el gránulo (Tester y Morrison 1990; Cooke y Gidley 1992; Hoover y Vansanathan 1994). Gernat y col (1993) establecieron que la cantidad de las dobles hélices y la cristalinidad en almidones nativos están relacionados positivamente con el contenido de amilopectina. Lo anterior corresponde con la correlación negativa encontrada en el presente estudio entre el contenido de amilosa y la entalpía de gelatinización ($r = -0.478$ $p < 0.001$). La variabilidad en ΔHG observada entre los genotipos de garbanzo sugiere diferencias estructurales importantes en los gránulos de almidón.

Los resultados de la retrogradación del almidón después de siete días a 4 °C se muestran en el Cuadro 7. Las temperaturas de transición y las entalpías fueron menores que las observados para el proceso de gelatinización, lo cual está asociado a diferentes formas cristalinas en el almidón nativo y retrogradado (Singh y Singh, 2007). La temperatura de retrogradación (T_pR) varió de 50.7 a 56.4 °C para los genotipos ICC3761 y Bco. Sin. 92, respectivamente, mientras que la entalpía de

retrogradación (ΔH_R) se encontró en un rango de 2.8 J/g (ICC5613) a 4.7 J/g (ICC4418 y 13124). La ΔH_R es un indicador de la desintegración y la fusión de las dobles hélices formadas durante el almacenamiento, la cual está influenciada por la distribución de la longitud de cadenas en las unidades de amilopectina (Shi y Seib, 1992). La diferencia en ΔH_R entre los diversos almidones de garbanzo sugiere diferencias en su tendencia a la retrogradación. En este sentido, el porcentaje de retrogradación (% R), el cual mide la tendencia del almidón gelatinizado a recristalizar con el almacenamiento, varió entre 34.4 (ICC14872) y 59.5 % (ICC3761). Singh y Lim (2008) reportan un valor promedio de 50 % en almidón de garbanzo almacenado bajo condiciones similares. Chung y Liu (2009) y Yu y col (2009) mencionan que la amilosa es la principal responsable de la retrogradación, debido a que sus cadenas lineales se unen a través de puentes de hidrógeno formando una malla que empieza a crecer o engrosarse conforme transcurre el tiempo de almacenamiento, por lo que a mayor contenido de amilosa mayor retrogradación. Esto coincide con la correlación positiva encontrada en el presente estudio entre el contenido de amilosa y el % R ($r= 0.471$, $p<0.001$). Los almidones que mostraron un alto grado de retrogradación, como el del genotipo ICC3761, son menos indicados para productos que necesitan almacenamiento bajo refrigeración.

C PERFIL DE COMPUESTOS CAROTENOIDES Y FENÓLICOS

1 Contenido de carotenoides totales

En el Cuadro 14 se muestra el contenido de carotenoides totales de los genotipos de garbanzo estudiados. En general los genotipos tipo desi presentaron mayores contenidos de carotenoides con un promedio de 17.9 $\mu\text{g/g}$ harina y un rango

Cuadro 14. Contenido de carotenoides totales de los genotipos de garbanzo.

Genotipo	Carotenoides totales ($\mu\text{g/g}$ harina bs)
Desi	
ICC5613	21.9 ^a
ICC6306	22.9 ^a
ICC5383	16.2 ^c
ICC4418	20.1 ^b
ICC3761	15.6 ^c
ICC14872	14.3 ^d
ICC13124	13.3 ^d
ICC3512	20.1 ^b
ICC3421	16.4 ^c
Promedio	17.9^a
Kabuli	
Bco. Sin. 92	8.4 ^g
Jumbo 2010	6.8 ^h
Blanoro	10.2 ^f
Progreso 95	11.4 ^e
Hoga 340	5.8 ^h
Hoga 021	10.6 ^{ef}
Promedio	8.9^b

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Fisher. Letras diferentes para los valores promedio indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los garbanzos de tipo desi y kabuli de acuerdo con una prueba t.

de variación entre 13.3 $\mu\text{g/g}$ (ICC13124) y 22.9 $\mu\text{g/g}$ (ICC6306). Estos valores corresponden con los reportados por Ashokkumar y col (2015) para 37 genotipos de garbanzo tipo desi, quienes registraron un valor promedio de 18.9 $\mu\text{g/g}$ harina y un rango de 9.8 - 30 $\mu\text{g/g}$ harina.

Los garbanzos tipo kabuli presentaron un contenido promedio de carotenoides totales de 8.9 $\mu\text{g/g}$ de harina, variando de 5.9 a 11.4 $\mu\text{g/g}$ para los genotipos Hoga 340 y Progreso 95, respectivamente. Estos valores son superiores al promedio reportado por Abbo y col (2005) para el genotipo kabuli Hadas (4.5 $\mu\text{g/g}$), pero se encontraron en el límite inferior o ligeramente por debajo del rango de 8.9 a 23.5 $\mu\text{g/g}$ encontrados por Ashokkumar y col (2015) en 84 genotipos de garbanzo tipo kabuli. El contenido de carotenoides totales fue aproximadamente dos veces mayor en los genotipos tipo desi, lo cual corresponde con la coloración que presentan estos genotipos mayormente en la testa del grano (Figura 2).

2 Perfil de carotenoides

Los carotenoides mayoritarios reportados en garbanzo son luteína y zeaxantina, seguidos en menor proporción por β -caroteno, α -caroteno, violaxantina y β -criptoxantina (Abbo y col 2005; Ashokkumar y col 2015). En el presente estudio se determinaron las concentraciones de luteína, zeaxantina y β -caroteno mediante HPLC por ser los más abundantes en los genotipos de garbanzo estudiados. La Figura 7 corresponde a un cromatograma representativo del perfil de carotenoides del genotipo ICC5613, donde se indican los picos correspondientes a los tres carotenoides mayoritarios que fueron identificados en las muestras.

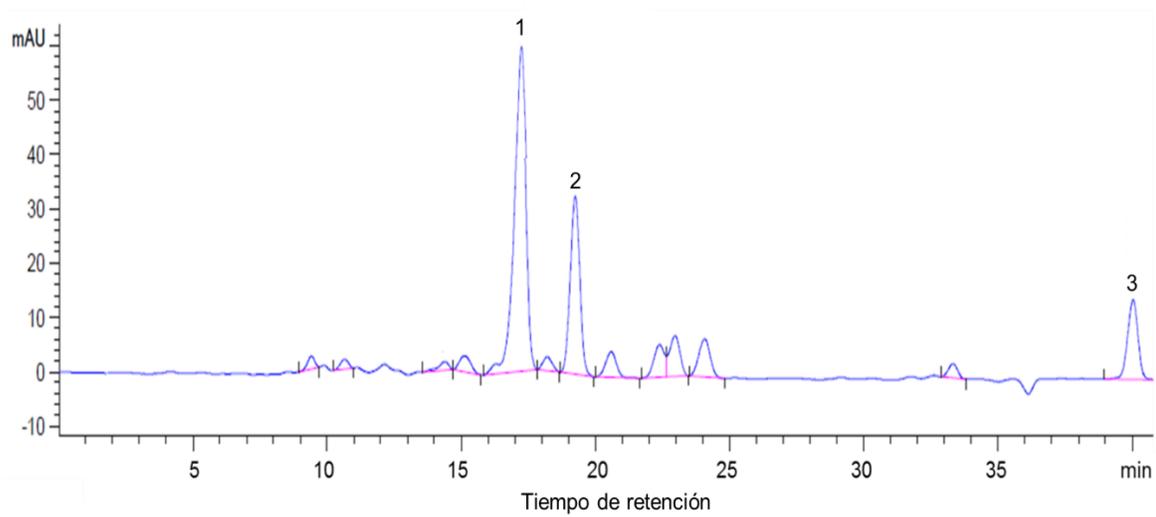


Figura 7. Cromatograma representativo del perfil de carotenoides correspondiente al genotipo de garbanzo ICC5613. Picos: 1, Luteína; 2, Zeaxantina; 3, β -caroteno.

En la Figura 8 se muestra el contenido de luteína encontrado en los 15 genotipos de garbanzo analizados, donde se puede observar una amplia variabilidad con valores que oscilan entre 2.3 y 14.4 $\mu\text{g/g}$. La mayoría de los genotipos desi presentaron valores significativamente mayores que los de tipo kabuli; el contenido promedio de luteína en genotipos desi fue de 9.9 $\mu\text{g/g}$, el cual es similar al valor promedio de 10.1 $\mu\text{g/g}$ reportado por Ashokkumar y col (2015) en 37 genotipos de garbanzo tipo desi. En el caso de los genotipos tipo kabuli, el contenido de este carotenoide varió entre 2.3 y 7 $\mu\text{g/g}$, con un promedio de 5.43 $\mu\text{g/g}$, valor casi dos veces mayor que el reportado por Abbo y col (2005) para el genotipo tipo kabuli Hadas (2.75 $\mu\text{g/g}$), pero inferior al promedio de 7.5 $\mu\text{g/g}$ encontrado por Ashokkumar y col (2015) en 84 genotipos de garbanzo tipo kabuli. Estas diferencias pueden atribuirse principalmente al genotipo y condiciones ambientales.

Con respecto al contenido de zeaxantina (Figura 9), los valores se encontraron entre 3.97 y 6.17 $\mu\text{g/g}$ de harina para garbanzo tipo desi, con un promedio de 4.76 $\mu\text{g/g}$, valor similar al reportado por Ashokkumar y col (2015) para el genotipo tipo desi 316B-42 (4.19 $\mu\text{g/g}$). El rango obtenido para los genotipos kabuli fue de 1.14 a 3.86 $\mu\text{g/g}$ para los genotipos Bco. Sin. 92 y Progreso 95, respectivamente; el valor promedio para estos genotipos fue de 2.5 $\mu\text{g/g}$, el cual es superior al promedio de 1.5 $\mu\text{g/g}$ reportado por EL-Qudah (2014) para genotipos de garbanzo de Estados Unidos.

En el caso de β -caroteno, éste se pudo observar en casi todos los genotipos tipo desi analizados, con excepción de ICC4418 (Figura 10). Tampoco fue detectable en los genotipos tipo kabuli Bco. Sin. 92, Jumbo 2010 y Blanoro.

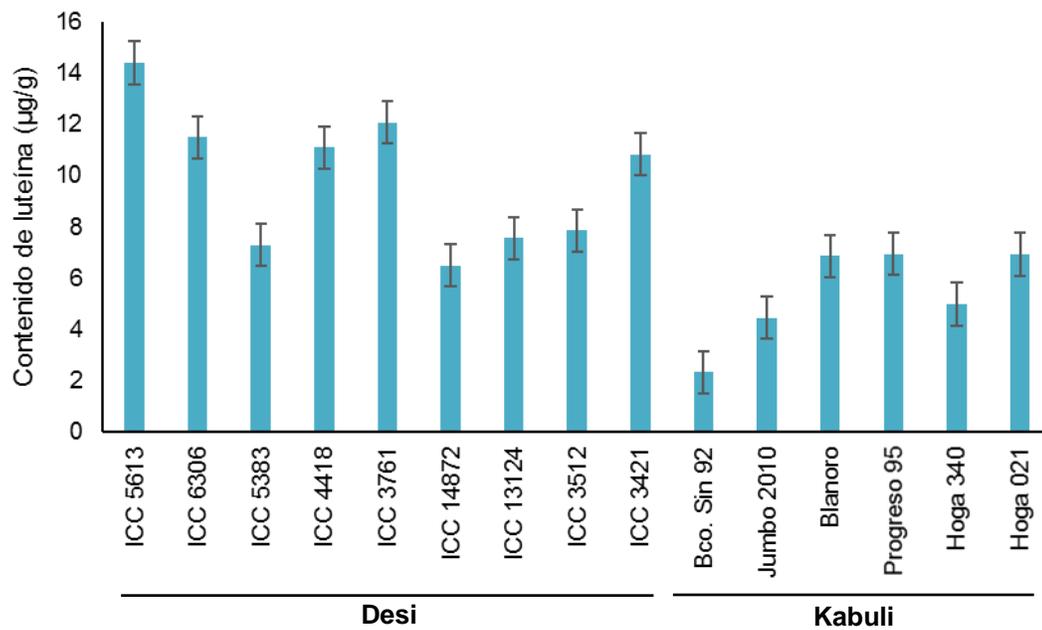


Figura 8. Contenido de luteína de los genotipos de garbanzo estudiados. Las barras indican el LSD (LSD=1.65; $\alpha=0.05$). Las medias son diferentes significativamente cuando las barras no se traslapan horizontalmente

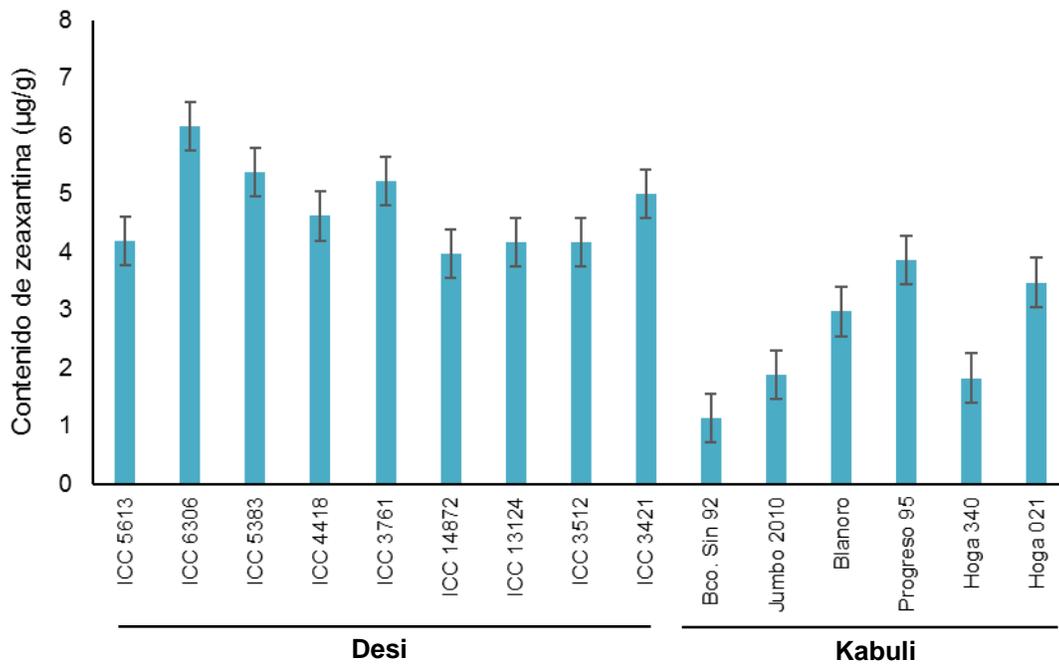


Figura 9. Contenido de zeaxantina de los genotipos de garbanzo estudiados. Las barras indican el LSD (LSD=0.83; $\alpha=0.05$). Las medias son diferentes significativamente cuando las barras no se traslapan horizontalmente.

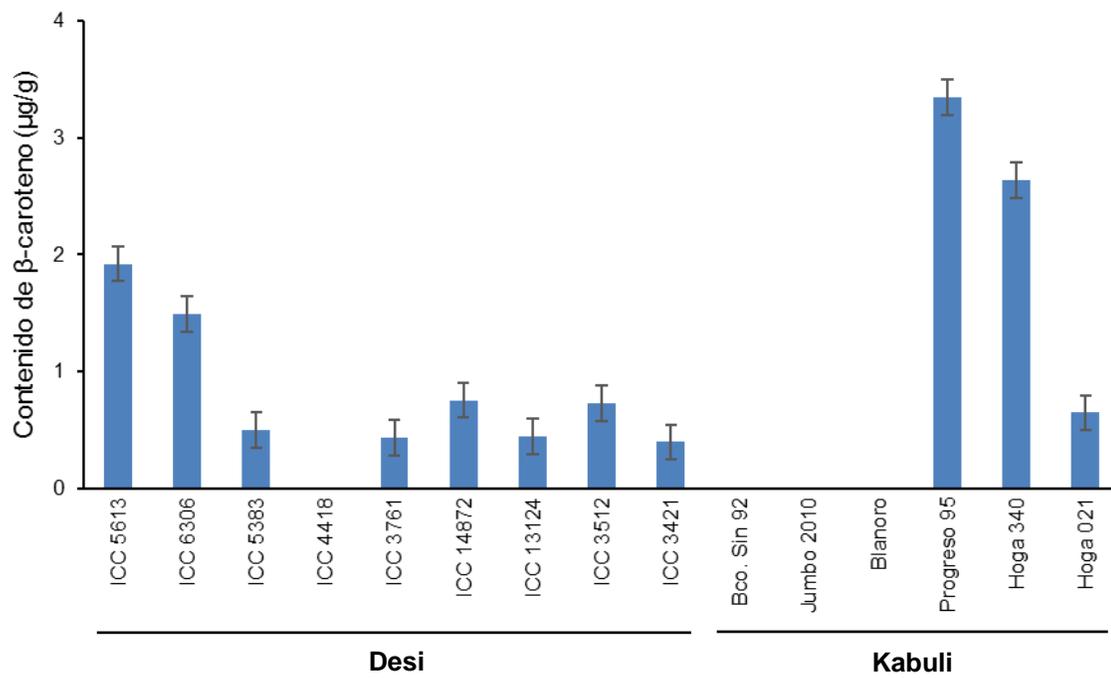


Figura 10. Contenido de β -caroteno de los genotipos de garbanzo estudiados. Las barras indican el LSD (LSD=0.3; $\alpha=0.05$). Las medias son diferentes significativamente cuando las barras no se traslapan horizontalmente.

Sin embargo, a pesar de que este carotenoide se observó en casi todos los genotipos tipo desi, su contenido fue en promedio 2.7 veces mayor en los garbanzos tipo kabuli donde pudo ser detectado. El genotipo que presentó mayor contenido de β -caroteno fue Progreso 95 con un valor de 3.34 $\mu\text{g/g}$, el cual cae dentro del rango reportado por Thavarajah y Thavarajah (2012) para 10 genotipos de garbanzo tipo kabuli crecidos en Dakota del Norte (1.7 a 4.3 $\mu\text{g/g}$). Dentro de los genotipos desi, ICC5613 presentó el mayor contenido de este carotenoide con 1.92 $\mu\text{g/g}$, valor similar al máximo reportado por Ashokkumar y col (2015) en genotipos tipo desi (2.57 $\mu\text{g/g}$).

3 Contenido de compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos representan uno de los grupos de metabolitos secundarios más abundantes en las leguminosas y son considerados como antioxidantes naturales (Dueñas y col 2004). Se cree que estos fitoquímicos contribuyen a la reducción de riesgo de enfermedades crónico-degenerativas (Canene y col 2005), por lo que en el presente estudio se determinó el contenido total y perfil de estos compuestos en los 15 genotipos estudiados a partir de extractos metanólicos.

En el Cuadro 15 se muestran los resultados del contenido de fenólicos totales. Los genotipos tipo desi presentaron en promedio 2.7 veces más fenólicos que los tipo kabuli. También se observó una variabilidad muy amplia en el contenido de fenólicos para los genotipos tipo desi, con un rango de valores desde 0.3 mg EAG/g (ICC 3421) hasta 1.4 mg EAG/g (ICC 4418) y un promedio de 0.7 mg EAG/g.

Cuadro 15. Contenido de fenólicos totales de los genotipos de garbanzo analizados.

Genotipo	Fenólicos totales mg EAG/g harina (bs)
Desi	
ICC 5613	0.9 ^c
ICC 6306	0.7 ^d
ICC 5383	0.6 ^e
ICC 4418	1.4 ^a
ICC 3761	0.5 ^f
ICC 14872	0.3 ^{hi}
ICC 13124	0.2 ⁱ
ICC 3512	1.3 ^b
ICC 3421	0.3 ^{hi}
Promedio	0.7^a
Kabuli	
Bco. Sin. 92	0.4 ^g
Jumbo 2010	0.2 ^j
Blanoro	0.2 ^j
Progreso 95	0.3 ^h
Hoga 340-2	0.3 ^h
Hoga 021	0.2 ^j
Promedio	0.3^b

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Fisher. Letras diferentes para los valores promedio indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los dos tipos de garbanzo de acuerdo con una prueba t.

Estos valores corresponden con lo reportado previamente por Zia-UI-Haq y col (2008) para seis genotipos de garbanzo tipo desi de Pakistan y Heiras-Palazuelos y col (2013) para cinco genotipos tipo desi (ICC5383, ICC13124, ICC3761, ICC4418 e ICC6306) crecidos en Sinaloa, donde se observaron contenidos de fenólicos totales en un rango de 0.92 a 1.1 mg EAG/g y 1.3 a 1.5 mg EAG/g, respectivamente.

Por otro lado, los genotipos de garbanzo tipo kabuli presentaron una menor variabilidad en el contenido de fenólicos totales (Cuadro 15), con un promedio de 0.3 mg EAG/g y un rango de 0.2 mg EAG/g (Blanoro) a 0.4 mg EAG/g (Bco. Sin. 92). Estos valores son similares a lo reportado por Fratianni y col (2014) para las variedades Cassano (0.14 mg EAG/g) y Castelcivita (0.18 mg EAG/g) del sur de Italia, pero son inferiores al promedio reportado por Xu y col (2007) para la variedad tipo kabuli Small amits (0.98 mg EAG/g) de Dakota del Norte y al rango reportado por Mekky y col (2015) para cinco genotipos de Egipto (0.7 a 1.3 mg EAG/g), lo cual podría deberse a las diferencias en la metodología de extracción, al genotipo y/o las diferencias en las condiciones de cultivo.

4 Perfil de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos de los genotipos se separaron por HPLC y se identificaron comparando los tiempos de retención y los espectros de cada pico con su estándar correspondiente (Figura 11). Se pudieron identificar tres compuestos del tipo ácido fenólico (ácido gálico, ácido p-hidroxibenzoico y ácido siríngico) y cinco del tipo flavonoide (catequina, miricetina, quercetina, genisteína y kaemferol). Sreerama y col (2010) identificaron estos mismos compuestos en testa y cotiledón de genotipos de garbanzo de la India, siendo quercetina el más abundante.

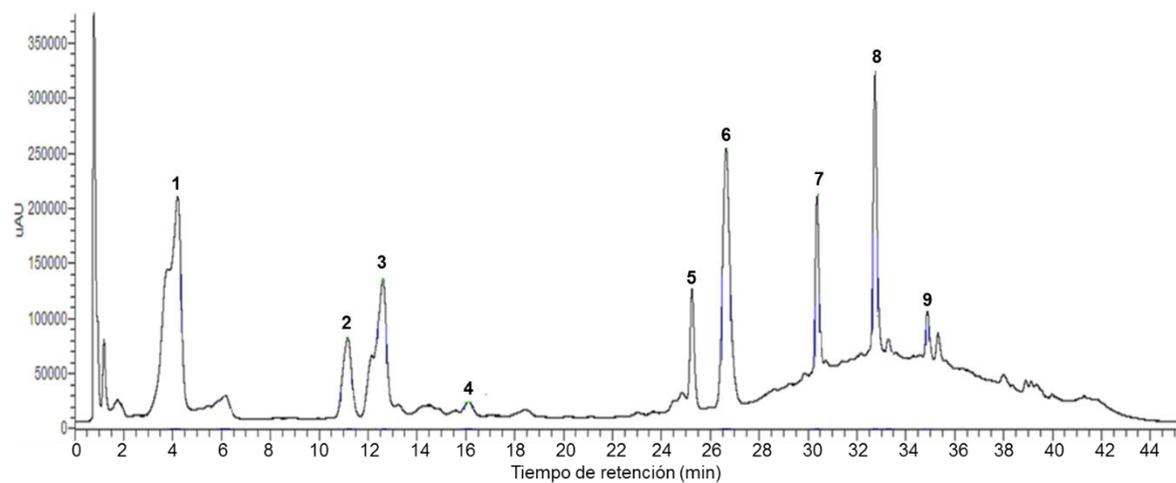


Figura 11. Cromatograma representativo del perfil de compuestos fenólicos correspondiente al genotipo de garbanzo ICC5613. 1, Ácido gálico; 2, Ácido p-hidroxibenzoico; 3, Catequina; 4, Ácido siríngico; 5, Ácido 2-hidroxicinámico (estándar interno); 6, Miricetina; 7, Quercetina; 8, Genisteina; 9, Kaemferol.

Por otro lado, Aguilera y col (2011) identificaron solamente quercetina, kaemferol y ácido p-hidroxibenzoico en el genotipo tipo kabuli Sinaloa, así como genisteína, ácido p-hidroxibenzoico y ácido p-cumárico en el genotipo Castellano. Los compuestos fenólicos que se encontraron en todos los genotipos analizados en el presente estudio fueron ácido gálico, ácido p-hidroxibenzoico y genisteína.

Mekkey y col (2015) identificaron los compuestos fenólicos de 6 genotipos de garbanzo provenientes de Egipto, encontrando 12 % más compuestos del tipo flavonoide (56%) que del tipo ácido fenólico (44%). Esto coincide con lo encontrado en este estudio, donde se pudieron observar 18% más compuestos del tipo flavonoide (59%) que del tipo ácido fenólico (41%).

En la Figura 12 se muestran los resultados del contenido relativo de ácido gálico en los 15 genotipos de garbanzo analizados. En general, el valor relativo promedio de ácido gálico en los granos de garbanzo tipo kabuli (1.79) fue 1.3 veces mayor que el encontrado en los granos tipo desi (1.06). El genotipo más sobresaliente en este compuesto fue Bco. Sin. 92 con un contenido 3.4 veces mayor que el del genotipo Jumbo 2010.

En el caso del ácido p-hidroxibenzoico se observó una gran variabilidad en los genotipos de garbanzo estudiados (Figura 13), siendo de nuevo Bco. Sin. 92 el más sobresaliente con un contenido 5.2 veces mayor que el genotipo Jumbo 2010. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el contenido relativo promedio de ácido p-hidroxibenzoico entre los genotipos tipo desi y kabuli.

En la Figura 14 se muestran los resultados del contenido relativo de ácido sirínico en los genotipos de garbanzo analizados. El contenido relativo promedio de este componente en los granos de garbanzo tipo desi (1.69) fue 2.7 veces mayor que

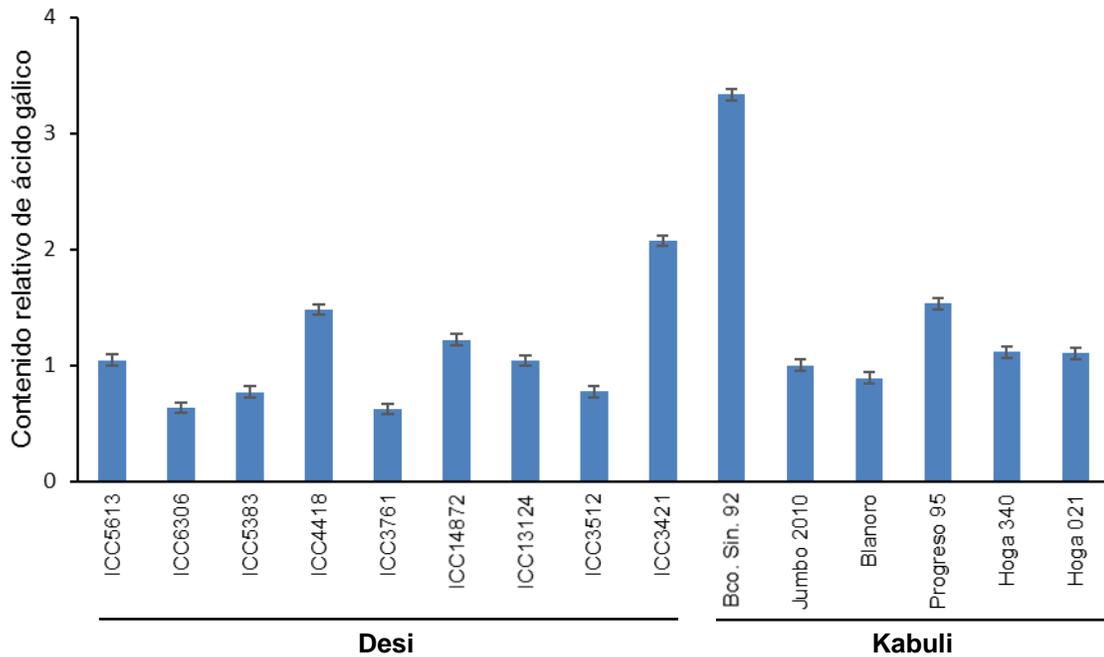


Figura 12. Contenido relativo de ácido gálico en los genotipos analizados. El contenido de ácido gálico del genotipo Jumbo 2010 se utilizó como referencia. Las barras indican el LSD (LSD=0.9; $\alpha=0.05$). Las medias son diferentes significativamente cuando las barras no se traslapan horizontalmente.

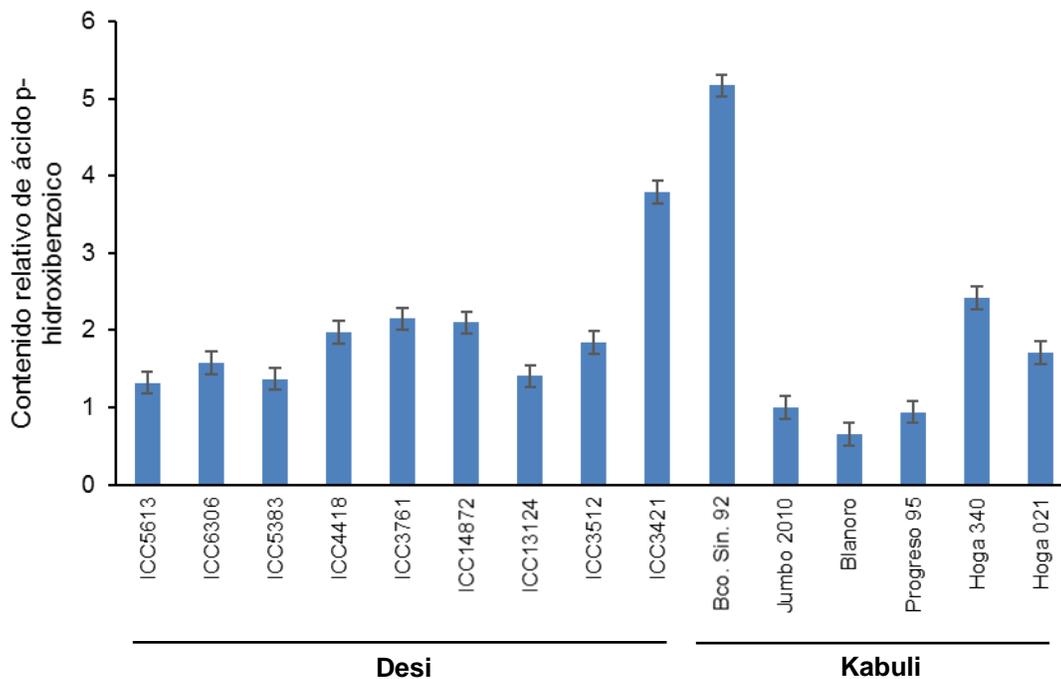


Figura 13. Contenido relativo de ácido p-hidroxibenzoico en los genotipos analizados. El contenido de ácido p-hidroxibenzoico del genotipo Jumbo 2010 se utilizó como referencia. Las barras indican el LSD (LD=0.3; $\alpha=0.05$). Las medias son diferentes significativamente cuando las barras no se traslapan horizontalmente.

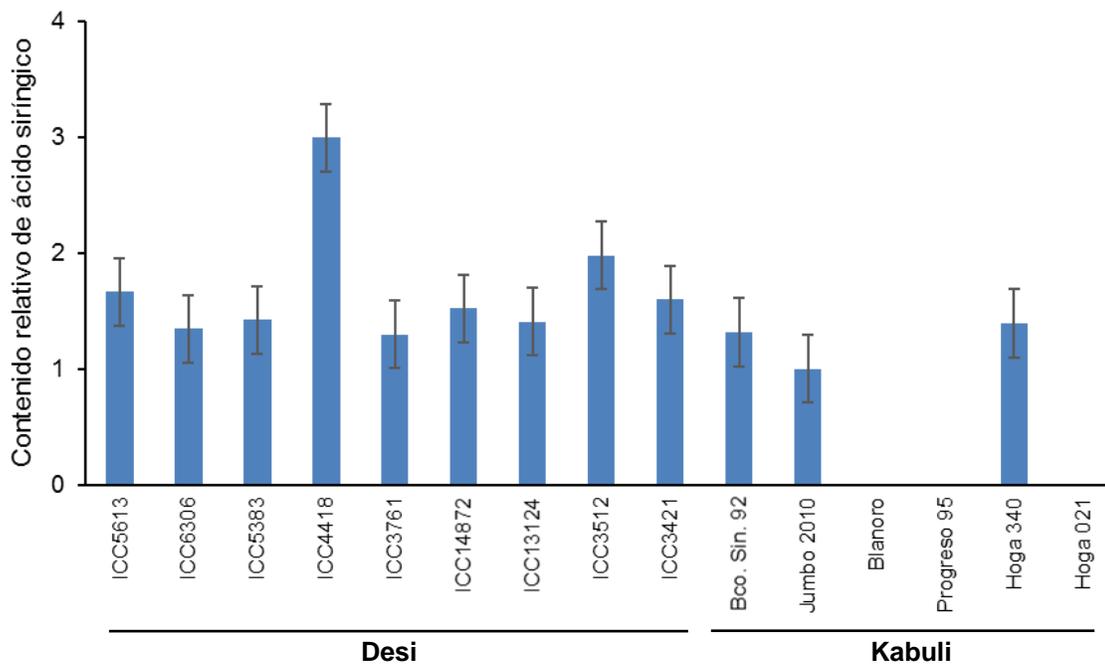


Figura 14. Contenido relativo de ácido siríngico en los genotipos analizados. El contenido de ácido siríngico del genotipo Jumbo 2010 se utilizó como referencia. Las barras indican el LSD (LSD=0.6; $\alpha=0.05$). Las medias son diferentes significativamente cuando las barras no se traslapan horizontalmente.

el encontrado en los tipo kabuli (0.62).

Los genotipos ICC4418 y Hoga 340 presentaron los valores de ácido siríngico más altos para desi y kabuli, respectivamente. Este compuesto fenólico no se pudo identificar en los genotipos Blanoro, Progreso 95 y Hoga 021.

En cuanto a los compuestos fenólicos del tipo flavonoide, el que presentó mayor variabilidad fue quercetina (Figura 15). Este compuesto se presentó mayormente en los genotipos tipo desi, aunque en promedio su contenido no fue significativamente mayor que en los de tipo kabuli, debido a que el genotipo Hoga 340 (kabuli) fue el que presentó el valor más alto de quercetina, siendo 15.7 veces mayor en comparación con Jumbo 2010.

Con respecto al contenido relativo de genisteína (Figura 16), el valor promedio de este componente en los garbanzos tipo desi (6.32) fue 5.2 veces mayor que en los tipo kabuli (1.22), siendo los genotipos ICC5613 (9.42), ICC4418 (9.74) e ICC3512 (9.83) los más sobresalientes con valores 9 veces mayores que el genotipo Jumbo 2010. Los genotipos con menores contenidos de genisteína fueron Blanoro y Progreso 95, con valores 1.4 veces inferiores al de Jumbo 2010. Este compuesto es muy importante, ya que se ha demostrado que isoflavonas extraídas de garbanzo ejercen una actividad hipoglucémica favorable (Li y col 2007). Recientemente, Li y col (2015) sintetizaron derivados de isoflavonas con base en la estructura de genisteína derivada de garbanzo e investigaron su actividad hipoglucémica usando un modelo celular HepG2 resistente a insulina. Los resultados mostraron que algunos de los derivados tuvieron mayores actividades que los precursores, mientras que la combinación de algunos de ellos con genisteína también fue muy efectiva. Se sugirió que la combinación de compuestos tiene un efecto mayor posiblemente

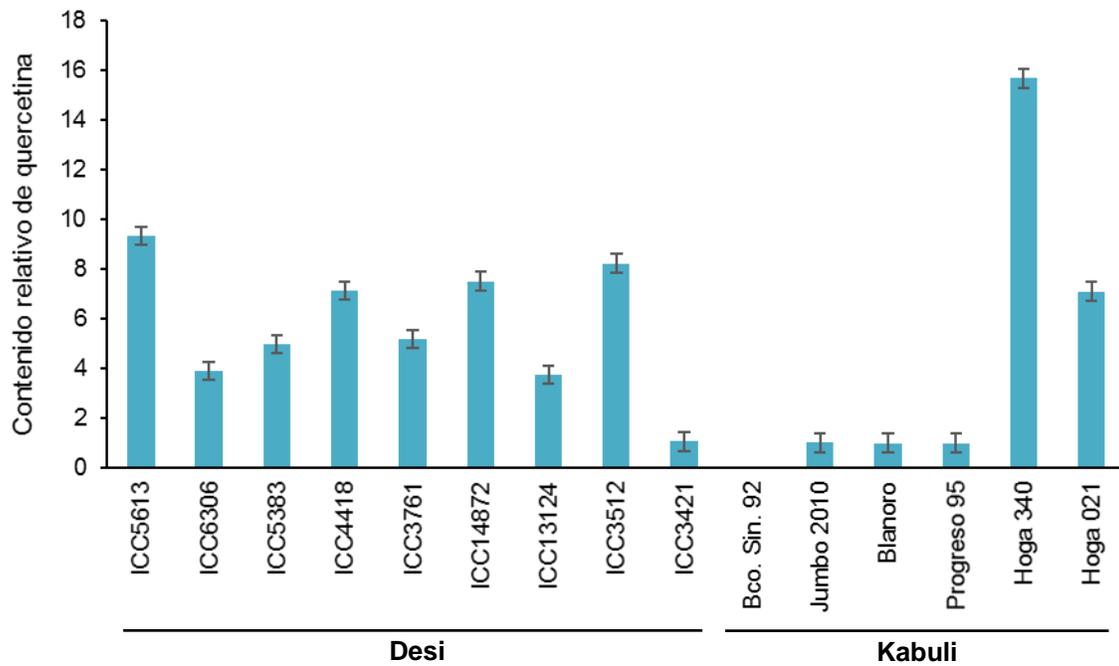


Figura 15. Contenido relativo de quercetina en los genotipos analizados. El contenido de quercetina del genotipo Jumbo 2010 se utilizó como referencia. Las barras indican el LSD (LSD=0.8; $\alpha=0.05$). Las medias son diferentes significativamente cuando las barras no se traslapan horizontalmente.

porque actúan de manera simultánea en varios sitios del organismo.

Los compuestos fenólicos catequina, miricetina y kaemferol se presentaron principalmente en los genotipos tipo desi (Figuras 17-19). Sin embargo, el mayor contenido relativo de catequina lo presentó el genotipo kabuli Bco. Sin. 92, él cual es 5.3 veces mayor que el encontrado en Jumbo 2010. El genotipo con menor contenido de catequina fue ICC13124 (0.9). En los genotipos ICC3421, Hoga 340 y Hoga 021 no se pudo identificar este compuesto fenólico (Figura 17).

En lo que respecta a miricetina, el contenido promedio de este compuesto en los garbanzos tipo desi fue 2.2 veces mayor que en los tipo kabuli, destacando el genotipo tipo desi ICC14872 que presentó valores 12.2 veces mayores que el genotipo Jumbo 2010.

En la Figura 18 se muestran los resultados del contenido relativo de kaemferol en los genotipos de garbanzo analizados. Este compuesto se presentó en todos los genotipos tipo desi analizados, con un valor relativo promedio de 5.22, mientras que en los genotipos tipo kabuli solamente se presentó en el genotipo Jumbo 2010. El genotipo más sobresaliente en kaemferol fue ICC4418 con un contenido 8 veces mayor que el del genotipo Jumbo 2010.

En general, los compuestos fenólicos del tipo ácido fenólico identificados se observaron en mayor proporción en los genotipos de garbanzo tipo kabuli, mientras que los del tipo flavonoide se observaron mayormente en los genotipos tipo desi. Esto corresponde con el hecho de que los garbanzos tipo desi presentan una gran diversidad de colores que van desde crema hasta el negro.

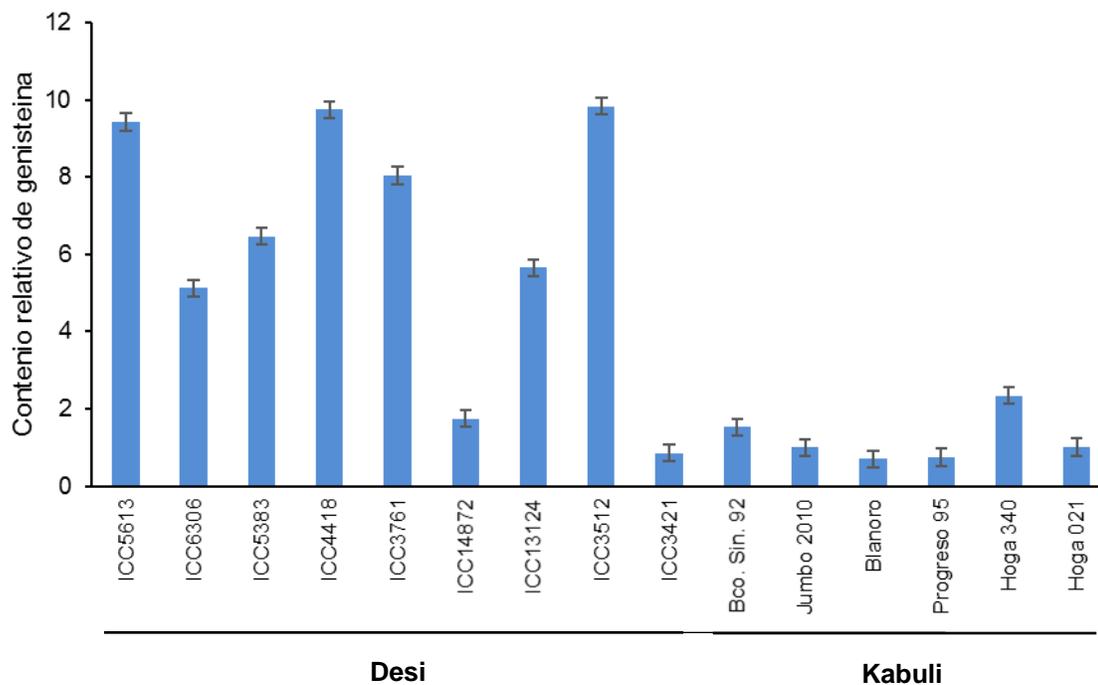


Figura 16. Contenido relativo de genisteína en los genotipos analizados. El contenido de genisteína del genotipo Jumbo 2010 se utilizó como referencia. Las barras indican el LSD (LSD=0.4; $\alpha=0.05$). Las medias son diferentes significativamente cuando las barras no se traslapan horizontalmente.

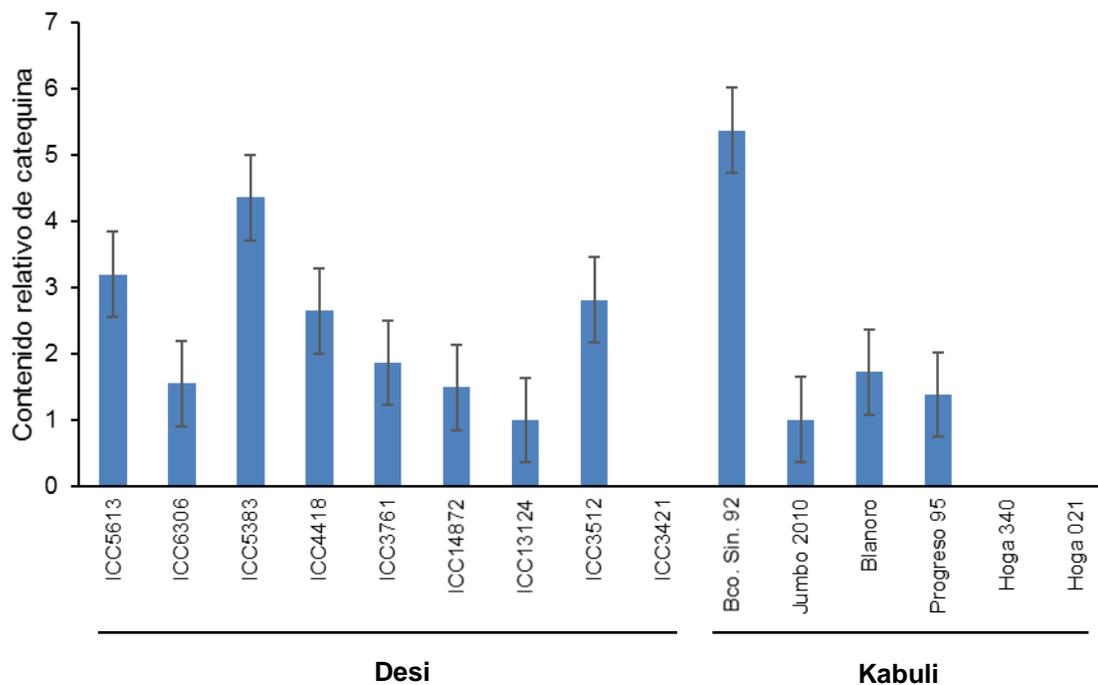


Figura 17. Contenido relativo de catequina en los genotipos analizados. El contenido de catequina del genotipo Jumbo 2010 se utilizó como referencia. Las barras indican el LSD (LSD=1.3; $\alpha=0.05$). Las medias son diferentes significativamente cuando las barras no se traslapan horizontalmente.

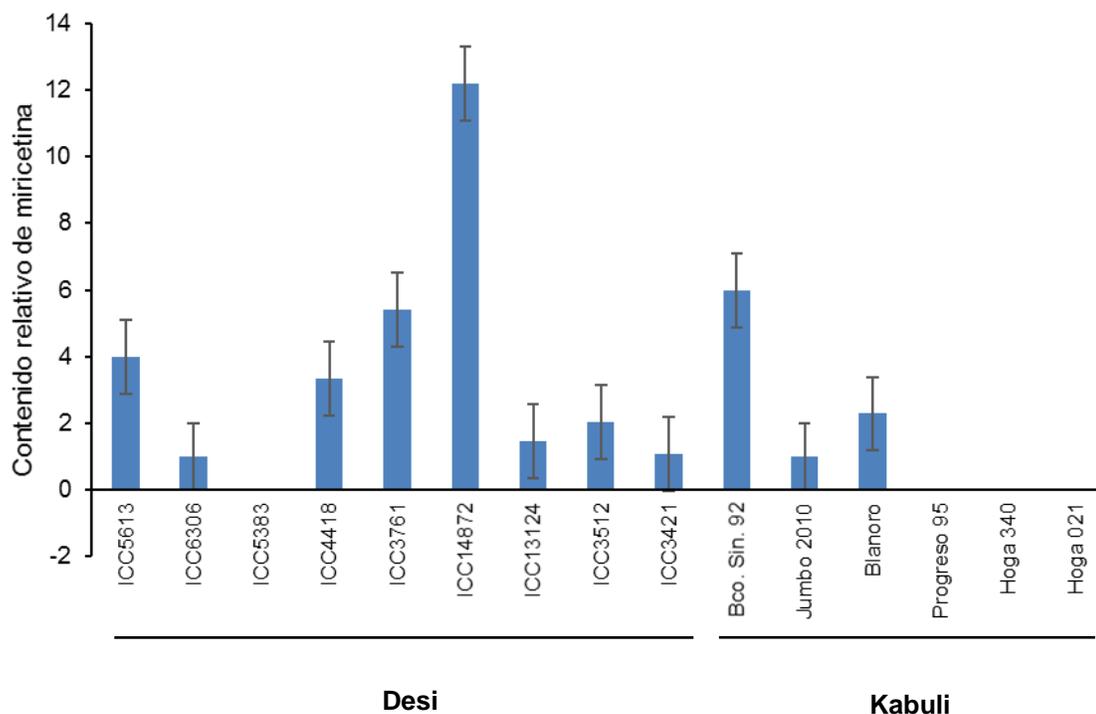


Figura 18. Contenido relativo de miricetina en los genotipos analizados. El contenido de miricetina del genotipo Jumbo 2010 se utilizó como referencia. Las barras indican el LSD (LSD=2.2; $\alpha=0.05$). Las medias son diferentes significativamente cuando las barras no se traslapan horizontalmente.

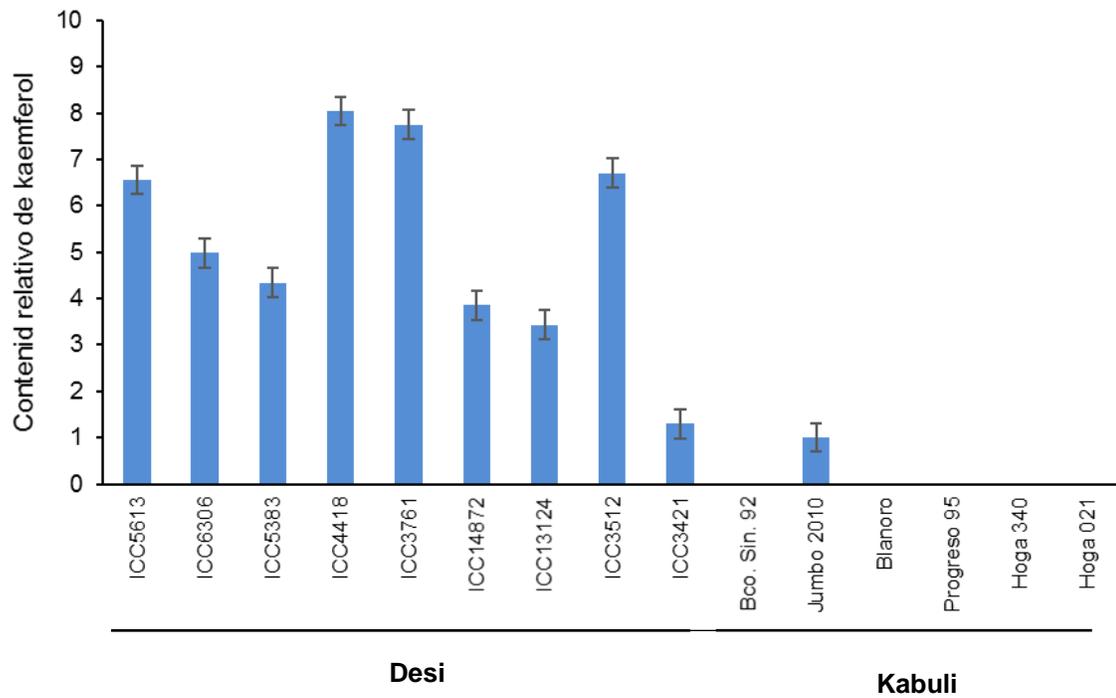


Figura 19. Contenido relativo de kaemferol en los genotipos analizados. El contenido de kaemferol del genotipo Jumbo 2010 se utilizó como referencia. Las barras indican el LSD (LSD=0.6; $\alpha=0.05$). Las medias son diferentes significativamente cuando las barras no se traslapan horizontalmente.

D VARIACIÓN ALÉLICA DE MICROSATÉLITES EN LOS GENOTIPOS DE GARBANZO ESTUDIADOS

La variabilidad genética de los 15 genotipos de garbanzo estudiados se determinó a partir de la variación alélica de 30 microsatélites distribuidos en el genoma. En la Figura 20 se muestra un ejemplo de la separación de los alelos del marcador TA200 en 5 individuos del genotipo ICC4418 (desi) y 5 individuos de Hoga 021 (kabuli). El análisis de los 15 genotipos con este marcador detectó dos alelos (333 y 347 pb) en los individuos del tipo desi y tres alelos (311, 333 y 347 pb) en los del tipo kabuli. En cada uno de los individuos analizados con los 30 marcadores solamente se observó una sola banda o alelo (homocigoto), lo cual coincide con lo observado previamente en estudios de variabilidad genética en garbanzo, donde se reporta un bajo porcentaje de heterocigosidad que va de 0 a 2% (Hüttel y col 1999; Upadhyaya y col 2008), atribuible a la naturaleza autógama de la planta.

En el Cuadro 16 se muestra la variación alélica de los 30 microsatélites en los 15 genotipos, así como el contenido de información polimórfica (CIP). En conjunto los 30 marcadores detectaron un total de 173 alelos en los 75 individuos analizados (5 por genotipo), con un rango de 2 a 10 alelos por locus y un promedio de 5.8. Este valor promedio es idéntico al reportado por Sethy y col (2006b) con un rango de 1 a 9 alelos por locus en 29 accesiones representativas de 9 especies anuales del género *Cicer*. Así mismo, es cercano a los valores obtenidos por Choudhary y col (2012), quienes reportaron un promedio de alelos por locus de 4.8 y un rango de 2 a 11 alelos por locus en un grupo de accesiones correspondientes a las especies *Cicer arietinum* (38 accesiones: 26 desi, 12 kabuli), *Cicer reticulatum* (6 accesiones) y *Cicer echinospermum* (4 accesiones).

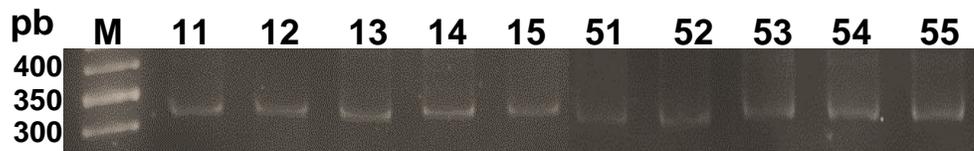


Figura 20. Separación de los alelos del microsatélite TA200 en 5 individuos del genotipo ICC4418 (11-15) de la colección ICRISAT y 5 individuos de Hoga 021 (51-55) de la colección INIFAP. A la izquierda se indican el tamaño del marcador de peso molecular (M) en pares de bases (pb).

Cuadro 16. Variación alélica y contenido de información polimórfica de los microsatélites utilizados.

Marcador	Número de Alelos	Rango de tamaño de alelos (pb)	Alelos		CIP
			Comunes (1-20%)	Frecuentes (>20%)	
CaSTMS2	7	269-326	6	1	0.83
CaSTMS15	4	267-322	1	3	0.66
CaSTMS21	2	170-183	0	2	0.34
NCPGR7	5	120-260	3	2	0.67
NCPGR6	6	225-290	4	2	0.78
NCPGR12	5	242-302	3	2	0.69
TA14	7	250-334	4	3	0.75
TA21	10	253-453	9	1	0.85
TA22	6	217-281	4	2	0.70
TA27	4	235-279	2	2	0.61
TA46	7	370-503	6	1	0.80
TA64	5	244-284	2	3	0.75
TA71	3	194-238	1	2	0.45
TA72	5	246-281	3	2	0.74
TA76S	5	114-245	6	1	0.72
TA113	7	157-244	3	2	0.82
TA118	5	98-107	3	2	0.75
TA130	5	223-288	3	2	0.76
TA135	5	154-229	3	2	0.70
TA200	6	287-364	3	3	0.75
TA206	7	339-457	6	1	0.80
TAASH	6	438-518	3	3	0.79
TAA58	6	288-386	4	2	0.75
TR2	5	233-286	3	2	0.72
TR7	6	195-246	4	2	0.74
TR29	7	171-337	6	1	0.81
TR31	7	192-252	7	0	0.83
TR43	7	325-430	6	1	0.76
TS84	6	226-341	4	2	0.71
NCPGR19	7	159-365	6	1	0.81
Total	173		118	55	
Promedio	5.77		3.93	1.83	0.73

CIP: Contenido de información polimórfica

Los 173 alelos detectados presentaron tamaños que variaron de 98 a 518 pares de bases (pb), de los cuales 118 fueron comunes (frecuencia entre 1 y 20%) y 55 frecuentes (frecuencia mayor al 20%) (Cuadro 16). Así mismo, se observaron 21 alelos raros con frecuencias menores al 1%, los cuales no se consideraron para análisis posteriores. De los 2,250 datos posibles (75 individuos y 30 marcadores), un 7.6% no se registraron debido a fallas en la amplificación o por ser alelos nulos.

El contenido de información polimórfica (CIP) se considera un indicador del poder de diferenciación de un marcador en un análisis de diversidad genética. Todos los marcadores utilizados fueron polimórficos a lo largo de los 75 individuos con un CIP promedio de 0.73 (Cuadro 16). El marcador con un menor CIP fue CaSTM21 (0.34), lo cual corresponde con el hecho de que este locus presentó solo dos alelos. En contraparte, el mayor valor de CIP obtenido fue de 0.85 y correspondió al marcador TA21 que permitió la amplificación de 10 alelos.

En relación a la diversidad genética total (HT), el valor obtenido para todos los genotipos fue de 0.76, valor cercano al reportado por Sethy y col (2006a), pero menor al 0.84 encontrado por Udupa y col (1999) en 78 accesiones de garbanzo del germoplasma de ICARDA. Estos resultados en conjunto con el alto número de alelos por locus y el contenido de información polimórfica, demuestran una amplia variabilidad genética en la población estudiada. Esta variación alélica permitió realizar un mapeo de asociación con características nutrimentales y nutracéuticas de los genotipos de garbanzo estudiados.

E MAPEO DE ASOCIACIÓN

Los programas de selección para mejoramiento tradicional de garbanzo han sido enfocados principalmente a características agronómicas. Dentro de los principales trabajos de mapeo genético se encuentran marcadores asociados con genes para la resistencia al marchitamiento por *Fusarium* (Cho y col 2002; Rajesh y col 2002b) y para resistencia a la plaga de ascochyta (Hüttel y col 1999; Rajesh y col 2002a; Flandez y col 2003), así como características de rendimiento y peso de la semilla (Abbo y col 2005; Cobos y col 2007; 2009; Hossain y col 2010). El garbanzo, como se describió en apartados anteriores, posee diversos componentes nutraceuticos y nutrimentales que resultan de gran importancia ya que han sido señalados como antioxidantes y preventivos contra enfermedades crónico-degenerativas. En este sentido, resulta de gran importancia el establecimiento de marcadores moleculares asociados a estas características para facilitar su mejoramiento.

El mapeo se realizó a partir de la variación alélica de los 30 microsatélites anteriormente descritos y los datos de cada una de las características evaluadas en el presente estudio; también se incluyeron datos de características físicas de la semilla (%testa, peso y calibre del grano), los cuales fueron proporcionados amablemente por Saracho-Peña (2015). En el Cuadro 17 se muestran los resultados obtenidos de este análisis.

De los 30 marcadores utilizados, 10 presentaron asociación significativa con alguna de las características evaluadas; la mayoría de ellos se encontraron asociados a características de interés nutraceutico, con excepción del marcador TA135 que se encontró asociado exclusivamente al contenido de proteína (albúmina)

Cuadro 17. Mapeo de asociación de características nutrimentales y nutracéuticas en garbanzo.

Marcador	Ubicación (LG)	Característica
TA113	1	Ácido gálico**, Ácido Siríngico**
TR2	3	Catequina***, Legumina 11S α **
TA135	3	Albúmina 2S**
TA130	4	Legumina 11S α **, Legumina 11S β **, Vicilina 7S**, Lipooxigenasa**
TR29	5	Ácido gálico***, Ácido p-hidroxibenzoico***, Ácido Siríngico***, Catequina**, Lipooxigenasa**, %Testa**
TA22	6	Albúmina 2S***, Lipooxigenasa***, Peso de 100 granos***, % R**, % Testa**, Carotenoides totales**, Zeaxantina**, Kaemferol**
TA21	7	Albúmina 2S**, Lipooxigenasa**, Vicilina 7S**
TA118	8	Genisteina***, Quercetina***, Lipooxigenasa**, Fenólicos totales**, Ácido Siríngico**, Amilosa**, Grado de Hinchamiento**, % R**, % Testa**, Calibre**, Peso de 100 granos**
TS84	-	Almidón**, Peso de 100 granos**
NCPGR6	-	Carotenoides totales***, Zeaxantina***, Peso de 100 granos***, % Testa**, Calibre**, Grado de Hinchamiento**, Lipooxigenasa**

LG: grupo de ligamiento (del inglés linkage group)

*, **, *** Asociación significativa a $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ y $p \leq 0.001$, respectivamente

Este marcador, al igual que TR2, se encuentran ubicados en el grupo de ligamiento 3, donde a su vez se encuentra el marcador TR26 que recientemente se reportó asociado al contenido de proteína por Jadhay y col (2015).

En relación al contenido de fenólicos, el marcador TR29 coincide con QTL reportados por Hossain y col (2010) en el grupo de ligamiento 5 para los parámetros de color L, a y b. Este marcador también se encontró asociado al contenido relativo de catequina, compuesto tipo flavonoide que en conjunto con carotenoides son responsables en mayor medida de la coloración del grano (negro, rojo, verde, café) que presentan los genotipos de garbanzo utilizados. Sin embargo, se requiere de un análisis de color en estas accesiones para corroborar el efecto de este marcador.

El marcador NCPGR6, cuya ubicación es desconocida, presentó una asociación altamente significativa con el contenido de carotenoides totales, zeaxantina y peso de 100 granos (Cuadro 17). Este marcador también fue identificado previamente por Castañeda-Domínguez (2011) para peso de 100 granos y coincide con los efectos reportados previamente por Abbo y col (2005; 2010), quienes observaron que materiales con mayor contenido en carotenoides presentan menor peso, lo que coincide además con las correlaciones inversas observadas en el presente estudio entre el peso de 100 granos y carotenoides totales ($r = -0.845$; $p < 0.001$), zeaxantina ($r = -0.780$ $p < 0.001$) y luteína ($r = -0.687$ $p < 0.001$).

El marcador TS84, del cual tampoco se conoce su ubicación, presentó asociación con el contenido de almidón y el peso de 100 granos. Esta relación puede atribuirse al hecho de que el almidón es el carbohidrato mayoritario en garbanzo, por lo que es de las macromoléculas que mayormente impactan en el peso del grano.

Cobos y col (2007) reportaron un QTL para peso del grano ubicado en el grupo de ligamiento 8, en el cual se ubica el marcador TA118 que también se asoció con el peso de 100 granos (Cuadro 17). Este marcador resulta muy interesante, ya que al parecer tiene un efecto pleiotrópico debido a que se encontró asociado con la mayoría de las características evaluadas en el presente estudio, así como con características de calidad del grano (% de testa, peso de 100 granos y calibre) previamente evaluadas en estos materiales por Saracho-Peña (2015), lo que sugiere la posibilidad de utilizar este marcador en el mejoramiento genético de garbanzo.

VIII CONCLUSIONES

- Los perfiles de proteínas mostraron una mayor acumulación de la fracción de globulinas, con una mayor proporción de las proteínas Legumina 11S y Vicilina 7S, mientras que la fracción de albúminas presentó una mayor variabilidad entre los genotipos y una mayor proporción de Albúmina 2S.
- Los garbanzos estudiados presentan un amplio rango en el contenido de amilosa, lo cual se relacionó con las principales propiedades fisicoquímicas del almidón (GH, Δ HG y %R). La variabilidad observada en estas propiedades sugiere diferencias estructurales importantes en el gránulo de almidón.
- Los garbanzos tipo desi presentaron en promedio mayor contenido de carotenoides y compuestos fenólicos tipo flavonoides, lo que corresponde con la coloración del grano de estos materiales, mientras que los genotipos kabuli presentaron una mayor proporción de ácidos fenólicos.
- El análisis de diversidad genética molecular reveló un alto número de alelos por locus y un alto valor de diversidad genética total, demostrando una amplia variabilidad genética en los genotipos seleccionados.
- Se encontró una asociación significativa ($p < 0.05$) entre las características evaluadas y algunos de los marcadores moleculares, destacando TA118 que se asoció con la mayoría de ellas.
- Los resultados demuestran una amplia variabilidad en características nutrimentales y nutracéuticas de los genotipos de garbanzo, lo cual permitió identificar marcadores moleculares asociados a dichas características con potencial uso en los programas de mejoramiento genético de garbanzo.

IX BIBLIOGRAFÍA

- Abbo S, Bonfil DJ, Kerem A, Berkovitch Z, Reifen R. 2010. Towards enhancing lutein concentration in chickpea, cultivar and management effects. *Plant Breeding* 129: 407-411.
- Abbo S, Molina C, Jungmann R, Grusak A, Berkovitch Z, Reifen R, Kahl G, Winter P, Reifen R. 2005. Quantitative trait loci governing carotenoid concentration and weight in seeds of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 11:185-95.
- Aguilera Y, Dueñas M, Estrella I, Hernández T, Benitez V, Esteban RM, Martín-Cabrejas. 2011. Phenolic profile and antioxidant capacity of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) as affected by a dehydration process plant foods for human nutrition 66:187-195.
- Anderson JW, Smith BM, Washnock CS. 1999. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *American Journal Clinical of Nutrition* 70:464S–74S.
- AOAC. 1999. Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists International, 16^{va} ed. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA
- ASERCA. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. 1997. Revista "Claridades Agropecuarias" Disponible en: <http://www.aserca.gob.mx/sicsa/claridades/marcos.asp?numero=42>
- Ashokkumar K, Diapari M, Jha AB, Tar'an B, Arganosa G, Warkentin TD. 2015. Genetic diversity of nutritionally important carotenoids in 94 pea and 121 chickpea accessions. *Journal of Food Composition and Analysis* 43:49-60.
- Atienza J, Sanz M, Herguedas A, Alejos JA, Jimenez JJ. 1998. β -carotene, α -tocopherol and γ -tocopherol contents in dry legumes: Influence of cooking: note. *Food Science and Technology International* 4:437-441.
- Barichello V, Yada RY, Coffin RH, Stanley DW. 1990. Low temperature sweetening in susceptible and resistant potatoes: starch structure and composition. *Journal of Food Science* 54:1054-1059.
- Baysal T, Demirdöven A. 2007. Lipoxygenase in fruits and vegetables: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 40:491-497.

- Beninger R. 2005. Structure-activity relationship studies of chemical mutagens and carcinogens. *Chemical Reviews* 105:1767-1800.
- Bennick A. 2002. Interaction of plant polyphenols with salivary protein. *Critical Review Oral Biology and Medicine* 13(2):184-196.
- Biliaderis CG. 1991. The structure and interactions of starch with food constituents. *Canadian Journal of Physiology Pharmacology* 69:60-78.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Bravo L, Siddhuraju P, Saura-Calixto F. 1998. Effect of various processing methods on the in vitro starch digestibility and resistant starch content of indian pulses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:4667-4674.
- Canene K, Campbell JK, Zaripheh S, Jeffery EH, Erdman JW. 2005. The tomato as a functional food. *Journal of Nutrition* 135:1226-30.
- Casey R, Domoney C, Ellis N. 1986. Legume storage proteins and their genes. En: Mifflin BJ, editors. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*. Oxford University Press, Oxford. p 1-95.
- Casey R, Domoney C, Smith AM. 1993. Biochemistry and molecular biology of seed products. En: Casey R, Davies DR, editors. *Peas: Genetics, molecular biology and biotechnology*. U.K. CAB International: Wallingford, U.K. p. 121–164.
- Cassidy A, Bingham SA, Cummings JH. 1994. Starch intake and colorectal cancer risk: and international comparison. *British Journal of Cancer* 69:937-942.
- Castañeda-Dominguez SE. 2011. Diversidad genética molecular de genotipos de garbanzo de interés alimentario. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Autónoma de Sinaloa. 103 p. Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Culiacán, Sinaloa, México.
- Chavan JK, Kadam SS, Salunkhe DK. 1987. Biochemistry and technology of chickpea (*Cicer arietinum L.*) seeds. *CRC Critical Reviews Food Science Nutrition* 25(2):107-156.
- Chavan JK, Kadam SS, Salunkhe DK. 1989. Chickpea. En Salunkhe DK, Kadam SS, editores. *Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing*

- Technology and Utilization. Vol I. Boca Raton, Florida, EUA. CRC Press, Inc. p. 247-288.
- Cho S, Kumar J, Shultz J, Anupama K, Tefera F, Muehlbauer F. 2002. Mapping genes for double podding and other morphological traits in chickpea. *Euphytica* 128:285–292.
- Choudhary S, Gaur R, Gupta S. 2012. EST-derived genic molecular markers: development and utilization for generating an advanced transcript map of chickpea. *Theoretical and Applied Genetics*. 124:1449-1462.
- Choudhary S, Sethy NK, Shokeen B, Bhatia S. 2009. Development of chickpea EST-SSR markers and analysis of allelic variation across related species. *Theoretical and Applied Genetics* 118(3):591–608.
- Chung HJ, Liu Q. 2009. Impact of molecular structure of amylopectin and amylose on amylose chain association during cooling. *Carbohydrate Polymers* 77:809-815.
- Cingilli H, Akçin A. 2005. High quality DNA isolation method for chickpea genotypes. *Turkish Journal of Biology* 29:1-5.
- Clemente A, Vioque J, Sanchez R, Pedrocha J, Bautista J, Millan F. 2000. Factors affecting the in-vitro protein digestibility of chickpeas albumins. *Journal Science Food Agricultural* 80:79–84.
- Cobos MJ, Rubio J, Fernandez MD, Garza R, Moreno MT, Milan T, Gil J. 2007. Genetic analysis of seed size. Yield and days to flowering in a chickpea recombinant inbred line population derived from a kabuli x desi cross. *Annals of Applied Biology* 151(1):33-42.
- Cobos MJ, Winter P, Kharrat M, Millán T, Cubero JI, Gil J, Rubio J. 2009. Genetic analysis of agronomic traits in a wide cross of chickpea. *Field Crop Research* 111:130–136.
- Cooke D, Gidley MJ. 1992. Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinization and origin of the enthalpic transition. *Carbohydrate Research* 227: 103-112.
- Crispín M, López G. 1976. El garbanzo: Un cultivo importante en México. CEVACU, INIFAP-SIN., SARH. Folleto técnico. p 29-43

- Cubero JI. 1987. Morphology of chickpea En: Saxena MC, Singh KB, editors. The Chickpea. Wallingford, Oxon, UK. CAB, International. p 35-75.
- Cubero JI. 2002. Introducción a la Mejora Genética Vegetal. 2da Edición. Editorial Grupo Mundi-Prensa. Madrid, España. 567 p.
- Dhawan K, Malhotra S, Dahiya BS, Singh D. 1991. Seed protein fractions and amino acid composition in gram (*Cicer arietinum*). Plant Foods for Human Nutrition 41: 225-232.
- Doll R. 1992. The lessons of life: Keynote address to the nutrition and cancer conference. Cancer Research 52:2024-2029.
- Donkena KV, Young CY, Tindall DJ. 2010. Oxidative stress and DNA methylation in prostate cancer. Obstetrics and Gynecology International doi:10.1155/2010/302051
- Duan XH, Jiang R, Wen YJ, Bin JH. 2013. Some 2S albumin from peanut seeds exhibits inhibitory activity against *Aspergillus flavus*. Plant Physiology and Biochemistry 66:84-90.
- Dueñas J, Estrella I, Hernández T. 2004. Occurrence of phenolic compounds in the seed coat and the cotyledon of peas (*Pisum sativum* L.). European Food Research and Technology 219:116-123.
- Dziuba J, Szerszunowicz I, Nałęcz D, Dziuba M. 2014. Proteomic analysis of albumin and globulin fractions of pea (*Pisum sativum* L.) seeds. Acta Scientiarum Polonorum Technology Alimentary 13(2):181-190.
- Eliasson AC, Gudmundsson M. 1996. Starch: physicochemical and functional aspects. En: Eliasson AC, editor. Carbohydrates in Food. New York, NY: Marcel Dekker Inc. p 431-482.
- EL-Qudah JM. 2014. Estimation of carotenoid contents of selected mediterranean legumes by HPLC. World Journal of Medical Sciences 10(1): 89-93.
- Englyst HN, Cummings JH. 1987. Digestion of polysaccharides of potato in the small intestine of man. American Journal Clinical of Nutrition 45:423-431.
- Englyst HN, Kingman SM, Cummings JH. 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. European Journal Clinical of Nutrition 46:S33-S50.

- Faisant N, Buleon A, Colonna P, Molis C, Lartigue S, Galmiche JP, Champ M. 1995. Digestion of raw banana starch in the small intestine of healthy humans: structural features of resistant starch. *British Journal of Nutrition* 73:111-123.
- FAOSTAT. 2015. Food Agriculture Organization. Database FAOSTAT. Disponible en: <http://faostat.fao.org>. Fecha de consulta: Octubre del 2015.
- Flandez GH, Ades PK, Ford R, Pang ECK, Taylor PWJ. 2003. QTL analysis for *ascochyta* blight resistance in an intraspecific population of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 107:1257–1265.
- Fратиanni F, Cardinalea F, Cozzolinoa A, Granesea T. 2014. Polyphenol composition and antioxidant activity of different grass pea (*Lathyrus sativus*), lentils (*Lens culinaris*), and chickpea (*Cicer arietinum*) ecotypes of the Campania region (Southern Italy). *Journal of functional foods* 7:551-557.
- Garzón- Tiznado JA, Ochoa-Lugo MI, Heiras-Palazuelos MJ, Domínguez-Aispuro DM, Cuevas-Rodríguez EO, Gutiérrez-Dorado R, Milán-Carrillo J, Reyes-Moreno C. 2012. Acceptability properties and antioxidant potential of desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) Cultivars. *Food Nutrition Sciences* 3:1281-1289.
- Garzón-Tiznado JA, Heiras-Palazuelos MJ, Espinoza-Moreno RJ, Cano-Campos M, Delgado-Vargas F, Gutiérrez-Dorado R, Milán-Carrillo J, Reyes-Moreno C. 2013. Antioxidant and antimutagenic activities of optimized extruded desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) flours. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences* 3(1): 38-47.
- Gernat C, Radosta S, Anger H, Damaschun G. 1993. Crystalline parts of three different conformations detected in native and enzymatically degraded starches. *Starch/Stärke* 45: 309-314.
- Gómez-Garza GRM, Salinas-Pérez RA, Gómez-Gómez L. 2003a. Blanco Sinaloa 92, variedad de garbanzo blanco para exportación. CIRNO-NOROESTE, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Valle de Culiacán, Folleto técnico No. 24, p 5-20.
- Gómez-Garza RM, Salinas-Pérez RA. 2001. Progreso-95: Variedad erecta de garbanzo para exportación. CIRNO-NOROESTE, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuaria (INIFAP) Valle de Culiacán, Folleto técnico No. 19, p 2-16.

- Gómez-Garza RM. 1990. Mocerito-88: Nueva variedad de garbanzo blanco para Sinaloa. CIRNO-NOROESTE, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuaria (INIFAP) Valle de Culiacán, Folleto técnico No. 12, p 1-8.
- Gómez-Garza RM, Salinas-Pérez RA, Gómez-Gómez L. 2003b. Suprema 03, variedad de garbanzo blanco para exportación. CIRNO-NOROESTE, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Valle de Culiacán, Folleto técnico No. 25, p 7-15.
- Grimaud F, Rogniaux H, James MG, Myers AM, Planchot V. 2008. Proteome and phosphoproteome analysis of starch granule-associated proteins from normal maize and mutants affected in starch biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 59:3395-3406.
- Guéguen J. 1991. Pea and fababean proteins. En Hudson BJB, editores. *Development in food proteins*. London, U.K. Elsevier Applied Science. p 35–78
- Guerrero-Soto EG. 2014. Caracterización del perfil de proteínas de genotipos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) y su asociación con la variabilidad genética. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Autónoma de Sinaloa. 85 p. Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Culiacán, Sinaloa, México.
- Gupta PK, Varshney RK. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113:163-85.
- Gutiérrez PE, Navejas JJ. 2009. COSTA 2004, Variedad de garbanzo recomendada para Baja California Sur. CIRNO-NOROESTE, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campo experimental Todos Santos, Sitio experimental Valle de Santo Domingo, Folleto técnico No. 3, p 4-32.
- Heiras-Palazuelos MJ, Ochoa-Lugo MI, Gutierrez-Dorado R, López-Valenzuela JA, Mora-Rochin S, Milán-Carrillo J, Garzón-Tiznado JA, Reyes-Moreno C. 2013. Technological properties, antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of pigmented chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *International Journal of Food Science and Nutrition* 64(1): 69-76.

- Heiras-Palazuelos MJ. 2012. Potencial antioxidante y antimutagénico de genotipos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) Efecto del procesamiento. [Tesis de doctorado] Doctorado Regional en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Sinaloa. 120 p. Culiacán, Sinaloa, México.
- Hildebrand DF, Hamilton-Kemp TR, Legg CS, Bookjans G. 1988. Plant lipoxygenases: occurrence, properties and possible functions. *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology* 7:201-219.
- Hiremath PJ, Kumar A, Penmetsa RV, Farmer A, Schlueter JA, Chamarthi SK, Whaley AM, Carrasquilla-García N, Gaur PM, Upadhyaya HD, Kavi Kishor PB, Shah TM, Cook DR, Varshney RK. 2012. Large-scale development of cost-effective SNP marker assays for diversity assessment and genetic mapping in chickpea and comparative mapping in legumes. *Plant Biotechnology Journal* 10(6):716–732.
- Hoover R. 2001. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate Polymers* 45:253–267.
- Hoover R, Vasanthan T. 1994. The effect of annealing on the physicochemical properties of wheat, oat, potato and lentil starches. *Journal of Food Biochemistry* 17:303-325.
- Hossain S, Ford R, McNeil D, Pittock C, Pannozzo JF. 2010. Inheritance of seed size in chickpea (*Cicer arietinum* L.) and identification of QTL base on 100-seed weight and seed size index. *Australian Journal of Crop Science* 4:126-135.
- Huang J, Schols HA, VanSoest JGG, Jin Z, Sulmann E, Voragen AGJ. 2007. Physicochemical properties and amylopectin chain profiles of cowpea, chickpea and yellow pea starches. *Food Chemistry* 101:1338-1345.
- Hughes T, Hoover R, Liu Q, Donner W, Chibber R, Jaiswal S. 2009. Composition, morphology, molecular structure and physicochemical properties of starches from newly released chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars grown in Canada. *Food Research International* 42:627-635.
- Huïsmán J, Van der Poel AFB. 1994. Aspects of the nutritional quality and use of cool season food legumes in animal feed. En: Muehlbauer FJ, Kaiser WJ, editores. *Proceedings of the Second International Food Legume Research Conference on*

- pea, lentil, faba bean, chickpea, and grasspea. Cairo, Egipto. Kluwer Academic Publishers. p 53-76.
- Hüttel B, Winter P, Weising K, Choumane W, Weigand F, Kahl G. 1999. Sequence-tagged microsatellite markers for chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Genome* 42:210-17.
- ICRISAT. Instituto de investigación de Cosechas internacional para Zona tropical Semiárida. 2015. Disponible en www.icrisat.org
- Jadhav AA, Rayate SJ, Mhase LB, Thudi M, Chitikineni A, Harer PN, Jadhav AS, Varshney RK, Kulwal PL. 2015. Marker-trait association study for protein content in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Genetics* 94:279-286.
- James MG, Denyer K, Myers AM. 2003. Starch synthesis in the cereal endosperm. *Physiology and Metabolism* 6:215–222.
- Johnson IT. 2003. Antioxidants and antitumor properties. En: Pokormy J, Yanishlieva N, Gordon M, editores. *Antioxidants in food*. Boca Raton, Florida, EUA. CRC Press. p. 100-123.
- Kadam SS, Deshpande SS, Jambhale Nd. 1989. Seed structure and composition. En: Salunkhe, DK, Kadam SS, editores. *Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilitation*. Vol. I. Boca Raton, Florida, EUA. CRC Press. p 97-109
- Kalogeropoulos N, Chiou A, Ioannou M, Karathanos VT, Hassapidou M, Andrikopoulos NK. 2010. Nutritional evaluation and bioactive microconstituents (phytosterols, tocopherols, polyphenols, triterpenic acids) in cooked dry legumes usually consumed in the Mediterranean countries. *Food Chemistry* 121:682-690.
- Kimura M, Rodriguez-Amaya DB, 2004. *Harvest Plus Handbook for Carotenoid Analysis*. Harvest Plus Technical Monograph. 2da edición. Washinton, DC. Cali: International Food Policy Research institute (IFPRI) and international Center for Tropical Agriculture (CIAT) p 51.
- Klug WS, Cummings MR, Spencer CA. 2006. *Conceptos de genética*. 8a ed. Pearson Educación, Madrid, España p 725-750.

- Knights EJ. 1994. Chickpea industry. En: Coombs B, editor. Australian grains: a complete reference book on the grain industry. Camberwell, Australia. Morescope Publishing. p 436-41.
- Konik-Rose CM, Moss R, Rahman S, Appels R, Stoddard F, Master GM. 2001. Evaluation of the 40 mg swelling test for measuring starch functionality. *Starch/Stärke* 53:14-20.
- Kottapelli P, Gaur PM, Katiyar SK, Crouch JH, Buhariwalla HK, Pande Suresh, Gali KK. 2009. Mapping and validation of QTLs for resistance to an Indian isolate of *Ascochyta* blight pathogen in chickpea. *Euphytica* 165:79-88.
- Kou X, Gao J, Xue Z, Zhang Z, Wang H, Wang X. 2013. Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. *Food Science and Technology* 50:591-598.
- Krieger KM, Pollak LM, Brumm TJ, White PJ. 1998. Effects of pollination method and growing location on starch thermal properties of corn hybrids. *Cereal Chemistry* 75:656-659.
- Krinsky NI. 1994. The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry* 66: 1003-1010.
- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal Medicine* 113:71S–88S.
- Kujur A, Bajaj D, Saxena MS, Tripathi S, Upadhyaya HD, Gowda CL, Singh S, Jain M, Tyagi AK, Parida SK. 2013 Functionally relevant microsatellite markers from chickpea transcription factor genes for efficient genotyping applications and trait association mapping. *DNA Research* 20(4):355–374.
- Kushi LH, Meyer KA, Jacobs DR. 1999. Cereal, legumes, and chronic disease risk reduction: evidence from epidemiologic studies. *American Journal Clinical of Nutrition* 70:451S–458S.
- Ladizinsky G. 1975. A new *Cicer* from Turkey. *Notes of the Royal Botanic Garden, Euphytica* 25:211-217.
- Ladizinsky G. 1995. Chickpea. En: Smartt J, Simmonds NW, editores. *Evolution of Crop Plants*. Harlow, U.K. Logman Scientific and Technical. p 258-261.

- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Li P, Shi X, Wei Y, Qin L, Sun W, Xu G, Xu T, Liu T. 2015. Synthesis and biological activity of isoflavone derivatives from chickpea as potent anti-diabetic agents. *Molecules* 20: 17016-17040.
- Li Y, Wu GZ, Zhang JS, Ma H. 2007. Effects of the isoflavone extract of *Cicer arietium* L. on blood level and oxidation-antioxidation status in diabetic mice. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research* 11:7625–7629.
- Liu K, Muse SV. 2005. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21:2128-2129.
- Liu S, Hon W, Yao P, Zhang B, Shanshan S, Nüssler K, Liu L. 2010. Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes. *Toxicology in vitro* 24(2):516-522.
- Luthria DL, Mukhopadhyay S, Krizek DT. 2006. Content of total phenolics acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. *Journal of Food Composition and Analysis* 19:771-777.
- Manjarrez SP, Gómez GRM, Gómez L. 2003. Tecnología de producción en el cultivo de garbanzo. Memoria: Jornadas de transferencia de tecnología del cultivo de garbanzo. Fundación Produce Sinaloa A.C. p 9-15.
- Manjarrez SP, Gómez GRM, Salinas PRA, Gómez GL, Armenta SJL. 2004. Blanco Sinaloa-92: Caso exitoso de mejoramiento genético de garbanzo en Sinaloa. CIRNO, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Valle de Culiacán, Folleto para productores No. 52, p 1-20.
- Meares CA, Bogracheva TY, Hill SE, Hedley CL. 2004. Developmental and testing methods to screen chickpea flours for starch characteristics. *Starch/Stärke* 56:215-224.
- Mekky RH, Contreras MM, El-Gindi MR, Abdel-Monem AR, Abdel-Sttar E, Segura-Carretero A. 2015. Profiling of phenolic and other compounds from Egyptian cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and antioxidant activity: a comparative study. *The Royal Society of Chemistry* 5:17751-17767.

- Meotti FC, Senthlmohan R, Harwood DT, Missau FC, Pizzolati MG, Kettle AJ. 2008. Myricitrin as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase: implications for the pharmacological effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 44(1):109-120.
- Miles MJ, Morris VJ, Orford PD, Ring SG. 1985. The Roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydrates Research* 135:271-281.
- Millan T, Winter P, Jungling R, Gil J, Rubio J, Cho S, Cobos MJ, Iruela M, Rajesh PN, Tekeoglu M, Kahl G, Muehlbauer FJ. 2010. A consensus genetic map of chickpea (*Cicer arietinum* L.) based on 10 mapping populations. *Euphytica* 175:175–189.
- Morales GJA. 1999. Tequi Blanco 98 y Desierto 98. Nuevas variedades de garbanzo para Sonora. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuaria (INIFAP) Costa de Hermosillo, Folleto técnico No. 20, p 3-18.
- Morales GJA, Jaime GR. 1993. Hermosillo 93 y Pitic 93 Nuevas variedades de garbanzo para la costa de Hermosillo. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Costa de Hermosillo, Folleto técnico No. 10, p 3-20.
- Moure A, Domínguez H, Parajó JC. 2006. Antioxidant properties of ultrafiltration recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Process Biochemistry* 41:447-456.
- Nayak SN, Zhu H, Varghese N, Datta S, Choi HK, Horres R. 2010. Integration of novel SSR and gene-based SNP marker loci in the chickpea genetic map and establishment of new anchor points with *Medicago truncatula* genome. *Theoretical and Applied Genetics* 120:1415–1441.
- Nei M, Kumar S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford, Reino Unido: Oxford University Press. 333 p.
- Oomah BD, Caspar F, Malcolmson LJ, Bellido AS. 2011. Phenolics and antioxidant activity of lentil and pea hulls. *Food Research International* 44:436–441.
- Oostergetel OGT, van Bruggen EFJ. 1993. The crystalline domains in potato starch granules are arranged in a helical fashion. *Carbohydrate Polymers* 21:7–12.

- Oplinger ES, Hardman LL, Oelke EA, Kaminski AR, Schulte EE, Doll JD. 1997. Chickpea (garbanzo bean). *Alternative Field Crops Manual*. p. 8
<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/chickpea.html>
- Özer S, Karaköy T, Toklu F, Baloch FS, Kilian B, Özkan H. 2010. Nutritional and physicochemical variation in Turkish kabuli chickpea landraces. *Euphytica* 175:237-249.
- Pace CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. 1995. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. *Clinica Chimica Acta* 235:207-219.
- Pauff JM, Hille R. 2009. Inhibition of xanthine oxidase by luteolin, silibinin, quercetin, and curcumin. *Journal of Natural Products* 72(4):725-731.
- Pennington JAT, Fisher R. 2010. Foods components profiles for fruits and vegetable subgroups. *Journal of Food Composition and Analysis* 23:411-418.
- Pfaff T, Kahl G. 2003. Mapping of gene-specific markers on the genetic map of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 269:243–251.
- Pineda-Hidalgo KV, Lavin-Aramburo M, Salazar Salas NY, Chavez-Ontiveros J, Reyes-Moreno C, Muy-Rangel MD, Larkins BA, López-Valenzuela JA. 2011. Characterization of free amino acid QTL in maize opaque2 recombinant inbred lines. *Journal of Cereal Science* 53:250-258.
- Pittaway J. 2006. Chickpeas and human health: The effect of chickpea consumption on some physiological and metabolic parameters. [Tesis de Maestría] Maestría en Ciencias Biomédicas. Universidad de Tasmania, Australia.
- Radhika P, Gowda SJM, Kadoo NY, Mhase LB, Jamadagni BM, Sainani MN, Chandra S, Gupta VS. 2007. Development of an integrated intraspecific map of chickpea (*Cicer arietinum* L.) using two recombinant inbred line populations. *Theoretical and Applied Genetics* 115:209–216.
- Rafalski JA, Tingey SV. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends in Genetics* 9:275-280.

- Rajesh PN, Tekeoglu M, Gupta VS, Ranjekar PK, Muehlbauer FJ. 2002a. Molecular mapping and characterization of RGAPtokin1-2171 in chickpea. *Euphytica* 128: 427–433.
- Rajesh PN, Tullu A, Gil J, Gupta VS, Ranjekar PK, Muehlbauer FJ. 2002b. Identification of an STMS marker for the double-podding gene in chickpea. *Theoretical and Applied Genetics* 105:604–607.
- Redrejo-Rodríguez M, Tejada-Cano A, Pinto MC, Macías P. 2004. Lipoxygenase inhibition by flavonoids: semiempirical study of the structure activity relation. *Journal of Molecular Structure* 674:121-124.
- Reifen R. 2002. Vitamin A as an antiinflammatory agent. *Proceedings of the Nutrition Society* 3:397–400.
- Rocha GNE, Herzog A, González LRF, Ibarra PFJ, Zambrano GG, Gallegos-Infante JA. 2007. Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chemistry* 103: 521-527.
- Rodríguez E, Herrera-Ruiz G, Pedraza AG, Loarca PG. 2009. Antioxidant capacity and antimutagenic activity of natural oleoresin from greenhouse grown tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Foods for Human Nutrition* 64:46-51.
- Saeed A, Darvishzadeh R, Basirinia A. 2013. Simple sequence repeat markers associated with agro-morphological traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Zemdirbyste-Agriculture* 100(4):433-440.
- SAGARPA. 2015. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola, México. Disponible en: <http://www.siap.sagarpa.gob>. Consultado en Noviembre del 2015.
- Sambrook J., Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual* (3er ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, p 1-68.
- Sánchez-Vioque R, Clemente A, Vioque J, Bautista J, Millán F. 1999. Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry* 64(2): 237–243.
- Sanz LC. 1992. Purificación y caracterización de isoenzimas de lipoxigenasa en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) var. Pedroxillano. [Tesis de doctorado]

- Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular. Universidad de Sevilla, España. 147 p.
- Saracho-Peña AG. 2015. Análisis de propiedades fisicoquímicas del almidón y proteínas asociadas al gránulo en genotipos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) de interés alimentario. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Autónoma de Sinaloa. 87 p. Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Culiacán, Sinaloa, México.
- Sathe SK, Mason AC, Weaver CM. 1987. Thermal aggregation of soybean (*Glycine max* L.) sulphur rich protein. *Journal of Food Science* (54):319-323.
- Saxena R, Venkaiah K, Anitha P, Venu L, Raghunath M. 2007. Antioxidant activity of commonly consumed plant foods of India: contribution of their phenolic content. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 58(4): 250-260.
- Sethy NK, Chaudhary S, Shokeen B, Bhatia S. 2006b. Identification of microsatellite markers from *Cicer reticulatum*: molecular variation and phylogenetic analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 112(2):347-357.
- Sethy NK, Shokeen B, Bhatia S. 2003. Isolation and characterization of sequence tagged-microsatellite markers in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular Ecology Notes* (3):428–430.
- Sethy NK, Shokeen B, Edwards KJ, Bhatia S. 2006a. Development of microsatellite markers and analysis of intraspecific genetic variability in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 112:1416-28.
- Shan F, Clarke HC, Plummer JA, Yan G, Siddique KHM. 2005. Geographical patterns of genetic variation in the world collections of wild annual *Cicer* characterized by amplified fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 381-391.
- Sharma DK, Muehlbauer FJ. 2007. *Fusarium* wilt of chickpea: physiological specialization, genetics of resistance and resistance gene tagging. *Euphytica* 157:1–14.
- Shi YC, Seib PA. 1992. The structure of four waxy starches related to gelatinization and retrogradation. *Carbohydrate Research* 227:131-145.

- Singh GD, Wani AA, Kaur D, Singh D. 2008b. Characterisation and functional properties of proteins of some Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88:778-786.
- Singh KB, Ocampo B. 1997. Exploitation of wild *Cicer* species for yield improvement in chickpea. Wallingford, U.K. CAB international. 127-162 p.
- Singh SK, Lim ST. 2008. Digestibility of legume starches as influenced by their physical and structural properties. *Carbohydrate polymers* 71:245-252.
- Singh N, Kaur S, Isono N, Noda T. 2010. Genotypic diversity in physico-chemical, pasting properties of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Chemistry* 122:65-73.
- Singh N, Sandhu SK, Kaur M. 2004. Characterization of starches separated from Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Journal of Food Engineering* 63:441-449.
- Singh R, Sharma P, Varshey RK, Sharma SK, Singh NK. 2008a. Chickpea improvement: role of wild species and genetic markers. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 25:267-314.
- Singh SK, Lim ST. 2008. Digestibility of legume starches as influenced by their physical and structural properties. *Carbohydrate polymers* 71:245-252.
- Singh SK, Singh N. 2007. Some properties of corn starches II: Physicochemical, gelatinization, retrogradation, pasting and gel textural properties. *Food Chemistry* 101: 1499-1507.
- Singh U. 1985. Nutritional quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.): Current status and future research needs. *Plant Food Human Nutrition* 35:339-35.
- Singh U, Jamburathan R. 1982. Distribution of seed protein fractions and amino acid in different anatomical parts of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). *Plant Food Human Nutrition* 32:347-54.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299:152-178.
- Skrabanja V, Liljeberg HGM, Hedley C, Kreft I, Bjöck IME. 1999. Influence of genotype and processing on the *in vitro* rate of starch hydrolysis and resistant

- starch formation in peas (*Pisum sativum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:2033-2039.
- Sreerame YN, Sashikala VB, Pratape VM. 2010. Variability in the distribution of phenolic compounds in milled fractions of chickpea and horse gram: evaluation of their antioxidant properties. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 58:8322-8330.
- Srichuwong S, Jane J. 2007. Physicochemical properties of starch affected by molecular composition and structures: a review. *Food Science and Biotechnology* 16:234-332.
- Sugihara N, Arakawa T, Ohnishi M, Furuno K. 1999. Anti- and pro-oxidative effect of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxy-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes cultured loaded with linolenic acid. *Free Radical Biology and Medicine* 27:1313-1323.
- Suriñach S, Baro MD, Bordas S, Clavaguera N, Clavaguera-Mora MT. 1992. La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la ciencia de materiales. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio* 31:11-17.
- Svendsen I, Nicolova D, Goshev I, Genov N. 1994. Primary structure spectroscopic and inhibitory properties of a two-chain trypsin inhibitor from the seeds of charlock (*Sinapsis arvensis* L.), a member of the napin protein family. *International Journal of Peptide and Protein Research* 43:425-430.
- Tautz D, Renz M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12:4127-4138.
- Tavano OL, DA Silva SI Jr, Demonte A, Neves VA. 2008. Nutritional responses of rats to diets based on Chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed meal or its protein fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:11006-11010.
- Taylor PWJ, Ford R. 2007. En: Chittaranjan Kole Editor, *Genome mapping and molecular breeding in plants Vol. 3: Pulses, Sugar and Tuber Crops*. 109-118 p.
- Tester RF, Morrison WR. 1990. Swelling and gelatinization of cereal starches. *Cereal Chemistry* 67:558-563
- Tester RF. 1997. Starch: the polysaccharide fractions. En: Frazier PJ, Donald AM, Richmond P, editores. *Starch: structure and functionality*. Cambridge, U.K. The Royal Society of Chemistry. p.163-171.

- Thavarajah D, Thavarajah P. 2012. Evaluation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) micronutrient composition: Biofortification opportunities to combat global micronutrient malnutrition. *Food Research International* 49:99-104.
- Thomas MR, Scott NS. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theoretical and Applied Genetics* 86: 985-90.
- Thudi M, Bohra A, Nayak SN, Varghese N, Shah TM, Penmetsa RV, Thirunavukkarasu N, Gudipati S, Gaur PM, Kulwal PL, Upadhyaya HD, Kavikishor PB, Winter P, Kahl G, Town CD, Kilian A, Cook DR, Varshney RK. 2011. Novel SSR markers from BAC-end sequences, DArT arrays and a comprehensive genetic map with 1,291 marker loci for chickpea (*Cicer arietinum* L.). *PLoS ONE* 6(11): e27275 doi:10.1371/journal.pone.0027275
- Thudi M, Upadhyaya HD, Rathore A, Gaur PM, Krishnamurthy L, Roorkiwal M, Nayak SN, Chaturvedi SK, Basu PS, Gangarao NV, Fikre A, Kimurto P, Sharma PC, Sheshashayee MS, Tobita S, Kashiwagi J, Ito O, Killian A, Varshney RK. 2014. Genetic dissection of drought and heat tolerance in chickpea through genome-wide and candidate gene-based association mapping approaches. *PLoS One* 9 e96758. doi:10.1371/journal.pone.0096758
- Tovar J, Björck IM, Asp NG. 1992a. Incomplete digestion of legume starches in rats: a study of precooked flours containing retrograded and physically inaccessible starch fractions. *Journal of Nutrition* 122:1500-1507.
- Tovar J, Granfeldt Y, Björck IM. 1992b. Effect of processing on blood glucose and insulin responses to starch in legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40:1846-1851.
- Udupa SM, Robertson LD, Weigand F, Baum M, Kahl G. 1999. Allelic variation at (TAA)_n microsatellite loci in a world collection of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm. *Molecular Genetics and Genomics* 261:354-363.
- Upadhyaya HD, Gowda CLL, Sastry DVSSR. 2008. Management of Germplasm Collections and Enhancing Their Use by Mini Core and Molecular Approaches. ICRISAT Genetic Resources.

- Varshney RK, Horres R, Molina C, Nayak S, Jungmann R, Swamy P, Winter P, Jayashree B, Kahl G, Hoisington DA. 2007. Extending the repertoria of microsatellite markers for genetic linkage mapping and germplasm screening chickpea. *Journal of SAT Agricultural Research* 5(1):1-3.
- Varshney RK, Murali Mohan S, Gaur PM, Gangarao NV, Pandey MK, Bohra A, Sawargaonkar SL, Chitikineni A, Kimurto PK, Janila P, Saxena KB, Fikre A, Sharma M, Rathore A, Pratap A, Tripathi S, Datta S, Chaturvedi SK, Mallikarjuna N, Anuradha G, Babbar A, Choudhary AK, Mhase MB, Bharadwaj Ch, Mannur DM, Harer PN, Guo B, Liang X, Nadarajan N, Gowda CL. 2013a. Achievements and prospects of genomics-assisted breeding in three legume crops of the semiarid tropics. *Biotechnology Advance* 31(8):1120–1134.
- Varshney RK, Song C, Saxena RK, Azam S, Sheng Yu, Sharpe AG, Cannon S, Baek J, Rosen BD, Tar'an B, Millan T, Zhang X, Ramsay DL, Iwata A, Wang Y, Nelson W, Farmer AD, Gaur PM, Soderlund C, Penmetsa RV, Xu C, Bharti AK, He W, Winter P, Zhao S, Hane JK, Carrasquilla-Garcia N, Condie JA, Upadhyaya HD, Luo MC, Thud Mi, Gowda CLL, Singh NP, Lichtenzweig J, Gali KK, Rubio J, Nadarajan N, Dolezel J, Bansal KC, Xu X, Edwards D, Zhang G, Kahl G, Gil J, Singh KB, Datta SK, Jackson SA, Wang J, Cook DR. 2013b. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. *Nature Biotechnology* 31:240–246.
- Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:4113-4117.
- Vioque J, Sánchez R, Clemente A, Pedroche J, Bautista J, Millán F. 1999. Purification and partial characterization of chickpea 2S albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:1404-1409.
- Vrinda S. 2001. Genetic diversity and linkage analysis in chickpea using DNA markers. [Tesis de doctorado]. Doctorado de filosofía en biotecnología. Universidad de Pune. India.
- Wang TL, Bogracheva TY, Hedley CL. 1998. Starch: as simple as A, B, C?. *Journal of Experimental Botany* 49:481–502.

- Winter P, Pfaff T, Udupa SM, Hüttel B, Sharma PC, Sahi S, Arreguin-Espinoza R, Weigand F, Muehlbauer FJ, Kahl G. 1999. Characterization and mapping of sequence-tagged microsatellite sites in the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome. *Molecular Genetics and Genomics* 262(1):90-101.
- Wood JA, Grusak MA. 2007. Nutricional value of chickpea. En: Yadav SS, Redden R, Chrn W, Sharma B, editores. *Chickpea Breeding and Management*. Cambridge, EA. Cabi Internacional. p 101.
- Wood JA, Knights EJ, Harden S. 2008. Milling performance in desi-type chickpea (*Cicer arietinum* L.): effects of genotype, environment and seed size. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88:108-105.
- Würsch P, Del Vedovo S, Koellreuter B. 1986. Cell structure and starch nature as key determinants of the digestion rate of starch in legumes. *American Journal of Clinical Nutrition* 43:25-29.
- Xu BJ, Yuan SH, Chang SKC. 2007. Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. *Journal of Food Science* 72(2):S167-S177.
- Yu S, Ma Y, Sun DW. 2009. Impact of amylose content on starch retrogradation and texture of cooked milled rice during storage. *Journal of Cereal Science* 50:139-144.
- Zeeman SC, Smith SM, Smith AM. 2007. The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochemical Journal* 401:13-28.
- Zhu LJ, Chen J, Tang XY, Xiong YL. 2008. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of *in vitro* digests of alcalase-treated zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:2714-2721.
- Zia-UI-Haq M, Ipbal S, Ahmad S, Branger MI, Wiczowski W, Amarowicz R. 2008. Antioxidant potential of desi chickpea varieties commonly consumed in Pakistan. *Journal of Lipids* 14:326-342.
- Ziegler RG. 1991. Vegetables, fruits, and carotenoids and the risk of cancer. *American Journal for Clinical Nutrition* 53:251S-259S.

ABREVIATURAS

%R	Porcentaje de retrogradación
ΔH_g	Entalpía de gelatinización
ΔH_r	Entalpía de retrogradación
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados
AOAC	Asociación oficial de químicos analíticos
ASERCA	Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria
BSA	Albúmina de suero bovino
CAE	Equivalentes de catequina
CEVACU	Campo Experimental Valle de Culiacán
CIP	Contenido de información polimórfica
Con A	Concanavalina A
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DTT	Ditiotreitol
EAG	Equivalentes de ácido gálico
ECA	Enzima convertidora de angiotensina I
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
FAOSTAT	Food Agriculture Organization
GH	Grado de hinchamiento
GOPOD	Glucosa oxidasa peroxidasa
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HT	Diversidad genética total
ICARDIA	Centro Internacional de Investigaciones Agrícolas en Zona Árida
ICRISAT	Instituto de investigación Internacional de Cultivos para Zonas Tropicales Semiáridas
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
LG	Grupo de ligamiento

LSD	Diferencia mínima significativa
ORAC	Capacidad de Absorbancia de Radicales Oxígeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVP 40	Polivinilpirrolidona
QTL	Loci de carácter cuantitativo
RAPD	ADN polimórfico amplificado al azar
RFLP	Polimorfismo en el tamaño de fragmentos de restricción
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S	Sedimentación
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio
SSR	Repetición de secuencia sencillas
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilnediamina
Tg	Temperatura de gelatinización
TpG	Temperatura pico de gelatinización
TpR	Temperatura pico de retrogradación