



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Análisis de expresión transcripcional de genes
relacionados con la síntesis de almidón y proteínas
en garbanzo (*Cicer arietinum* L.)**

TESIS

Que presenta

IBQ. ERIKA MARICELA GUERRERO SOTO

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIA

Y

TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Directores

MC. JEANETT CHÁVEZ ONTIVEROS

DR. JOSÉ ANTONIO GARZÓN TIZNADO

Culiacán, Sinaloa, México

Enero de 2017

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección de la MC. Jeanett Chávez Ontiveros y el Dr. José Antonio Garzón Tiznado, así como la asesoría del Dr. José Ángel López Valenzuela. Contó con financiamiento del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI 2014/052) de la Universidad Autónoma de Sinaloa. La IBQ. Erika Maricela Guerrero 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 18 del mes enero del año 2017, el (la) que suscribe IBQ. Erika Maricela Guerrero Soto alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos con número de cuenta 0915577-5, 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 "Análisis de expresión transcripcional de genes relacionados con la síntesis de almidón y proteínas en 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.

Erika Maricela

IBQ. Erika Maricela Guerrero Soto

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme vivir esta etapa plenamente, por los momentos buenos y difíciles, y por siempre tenerme de la mano.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, especialmente al programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de alimentos por haberme brindado la oportunidad de cumplir una de mis metas a nivel profesional.

A todos los profesores que forman parte de la Maestría de Alimentos, por compartir sus conocimientos para ser de mí una mejor profesionista y una mejor persona.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa de Fomento y Apoyo a la Investigación (PROFAP) de la Universidad Autónoma de Sinaloa, por el apoyo económico otorgado durante mi estancia en la maestría, así como para la realización de este trabajo.

A mis directores de tesis la MC. Jeanett Chávez Ontiveros y al Dr. José Antonio Garzón Tiznado por depositar su confianza en mí al darme la oportunidad de formar parte de este proyecto, por brindarme todo su apoyo para ayudarme a cumplir una de mis metas.

Al Dr. José Ángel López Valenzuela por darme la oportunidad nuevamente de formar parte de su equipo de trabajo, por todas las enseñanzas, confianza y paciencia en los momentos difíciles. ¡Gracias por ser un gran padre académico!

A las Dras. Karen Virginia Pineda Hidalgo y Nancy Yareli Salazar Salas por su paciencia, apoyo y disposición en todo momento, por sus consejos y cariño, por estar ahí siempre que las necesitaba.

Al MC. Elthon Vega Álvarez por su apoyo incondicional, su paciencia, sus consejos y por esas palabras de aliento que me ayudaban a continuar.

A mis compañeros de Generación 2014, especialmente a Gisela, Alma, Cristian, Milton y David, por estar siempre para mí, por las risas, los llantos, por todo lo vivido y compartido durante este camino que no fue fácil pero lo logramos.

A mis dos grandes amigos David y Milton, por el apoyo y palabras de aliento que recibí desinteresadamente, por ayudarme a creer en mí, por dejar en mi recuerdos inolvidables. ¡Los quiero!

A mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular: Dennise, Alex, Alexis, Glenda, Fer, Christian, Itzel, David, Milton y Elthon, gracias por todo el apoyo brindado por convertir el laboratorio en mi segundo hogar y hacer que 12

horas de trabajo se conviertan en nada al estar rodeada de tanta alegría, gracias por su amistad.

A Abraham por tantos años de cariño, porque pase lo que pase siempre está al pendiente de mí, con las palabras exactas para ayudarme a continuar, por su apoyo y comprensión durante el transcurso de esta etapa. ¡Te Quiero!

Gracias a mi familia, por su cariño y apoyo, a mis padres Jesús y María por los sacrificios realizados para que pudiera llegar hasta donde hoy estoy, son mi mayor orgullo y motivación; a mi hermana Mónica por su apoyo, por aguantar mis cambios repentinos de humor, por hacer que esta familia sea la mejor que Dios me pudo dar, ¡Los amo!

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 GENERALIDADES DEL GARBANZO	7
1 Origen y taxonomía	7
2 Producción e Importancia económica	13
B COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GRANO DE GARBANZO	16
1 Carbohidratos	16
a Almidón	16
1) Estructura química	19
2) Biosíntesis de almidón	22
2 Proteínas	26
a Globulinas	27
b Glutelinas	28
c Albúminas	29
d Prolaminas	30
3 Lípidos	30
4 Compuestos fitoquímicos	31

C MEJORAMIENTO Y VARIABILIDAD GENÉTICA DEL GARBANZO	33
D EXPRESIÓN DE GENES EN LEGUMINOSAS	37
1 Principales técnicas utilizadas en el análisis del transcriptoma	39
2 Estudios de expresión transcripcional en leguminosas	40
IV JUSTIFICACIÓN	44
V HIPÓTESIS	45
VI OBJETIVOS	46
A OBJETIVO GENERAL	46
B OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
VII MATERIALES Y MÉTODOS	47
A MATERIALES	47
B MÉTODOS	47
1 Obtención de harinas	47
2 Propiedades fisicoquímicas del almidón	47
a Determinación de almidón total	47
b Aislamiento de gránulos de almidón	50
c Determinación de amilosa y amilopectina	50
1) Pretratamiento del almidón	50
2) Precipitación de amilopectina y determinación de amilosa	51
3) Determinación de almidón total	52
d Propiedades térmicas del almidón	52
3 Perfiles de proteínas asociadas al gránulo de almidón y de almacenamiento	53

a Cuantificación de proteína total	53
b Extracción de proteínas asociadas al gránulo de almidón	54
c Extracción de las fracciones de proteínas de almacenamiento	54
d Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	55
e Identificación de proteínas por espectrometría de masas	56
4 Análisis de expresión de genes de síntesis de almidón y proteínas de almacenamiento por qRT-PCR	58
a Extracción de ARN total	58
b Tratamiento del ARN con DNAsa	59
c Síntesis de ADNc	59
d Análisis de expresión de genes	60
5 Análisis estadístico	62
VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
A PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL GRÁNULO DE ALMIDÓN	64
1 Contenido y composición de almidón	64
a Contenido de almidón total	64
b Contenido de amilosa y amilopectina	66
2 Propiedades térmicas del almidón	69
B CONTENIDO Y PERFIL DE PROTEÍNAS ASOCIADAS AL GRÁNULO DE ALMIDÓN Y PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO	72
1 Contenido de proteína total	72
2 Acumulación de proteínas asociadas al gránulo de almidón	74

3 Acumulación de proteínas de almacenamiento	78
a Albúminas	78
b Globulinas	83
C CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES DE SÍNTESIS DE ALMIDÓN Y PROTEÍNAS EN GRANOS EN DESARROLLO DE LOS GENOTIPOS DE GARBANZO	88
1 Genes de enzimas de síntesis de almidón	88
a Isoamilasa	88
b Enzima ramificadora de almidón	90
c Almidón sintasa unida al gránulo	92
2 Genes de proteínas de almacenamiento	94
a Lipoxigenasa	94
b Vicilina	96
c Legumina	98
IX CONCLUSIONES	101
X BLIBIOGRAFÍA	103
ABREVIATURAS	122

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Partes aéreas de una planta de garbanzo	10
2	Granos de genotipos de garbanzo	12
3	Estructura química de amilosa y amilopectina	20
4	Esquema general de la biosíntesis de almidón	23
5	Genotipos de garbanzo utilizados como materiales	48
6	Perfil de proteínas asociadas al gránulo de almidón (PAG) de granos de garbanzo en estado maduro	75
7	Separación por SDS-PAGE de la fracción de albúminas de granos en desarrollo y maduro de genotipos de garbanzo	79
8	Separación por SDS-PAGE de la fracción de globulinas de granos en desarrollo y maduro de genotipos de garbanzo	84
9	Expresión relativa del gen que codifica para la enzima isoamilasa en granos de garbanzo en desarrollo	89
10	Expresión relativa del gen que codifica para la enzima ramificadora de almidón en granos de garbanzo en desarrollo	91
11	Expresión relativa del gen que codifica para la enzima almidón sintasa unida al gránulo en granos de garbanzo en desarrollo	93
12	Expresión relativa del gen que codifica para la enzima lipoxigenasa en granos de garbanzo en desarrollo	95
13	Expresión relativa del gen que codifica para la proteína de almacenamiento vicilina en granos de garbanzo en desarrollo	97

14	Expresión relativa del gen que codifica para la proteína de almacenamiento legumina en granos de garbanzo en desarrollo	99
----	---	----

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1	Taxonomía del garbanzo (<i>Cicer arietinum</i> L.).	9
2	Principales países productores de garbanzo (2014)	14
3	Principales estados productores de garbanzo en México (2014)	15
4	Composición química del grano de garbanzo	17
5	Iniciadores utilizados para el análisis de expresión génica mediante PCR en tiempo real	61
6	Contenido de almidón total en granos en desarrollo y maduro de genotipos de garbanzo	65
7	Porcentaje de amilosa y amilopectina en almidón de granos en desarrollo y maduro de los genotipos de garbanzo	67
8	Contenido de amilosa y amilopectina total en genotipos de garbanzo en desarrollo y maduro	68
9	Propiedades térmicas de almidón de garbanzo en desarrollo y maduro	70
10	Contenido de proteína total en genotipos de garbanzo maduro	73
11	Identificación por espectrometría de masas en tándem de proteínas asociadas al gránulo de almidón genotipos de garbanzo	76
12	Análisis densitométrico de las fracciones de proteínas asociadas al gránulo de almidón en los genotipos de garbanzo	77

evaluados

13	Identificación por espectrometría de masas en tándem de proteínas de almacenamiento correspondientes a la fracción de albúminas en genotipos de garbanzo	80
14	Cuantificación densitométrica de la fracción de albúminas	82
15	Identificación por espectrometría de masas en tándem de proteínas de la fracción de globulinas en genotipos de garbanzo	85
16	Cuantificación densitométrica de la fracción de globulinas	87

I RESUMEN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es la segunda leguminosa en importancia económica en el mundo y representa una buena fuente de proteínas y carbohidratos en la dieta humana. El contenido de estos componentes depende del estado de desarrollo de la semilla y presenta una amplia variabilidad asociada a la gran diversidad genética de esta leguminosa, lo cual es de utilidad en programas de mejoramiento genético. La identificación de genes asociados con características de interés puede apoyarse del análisis de expresión a nivel transcripcional de genes candidatos en genotipos contrastantes en dichas características. Estudios del transcriptoma de garbanzo han identificado genes clave en procesos de desarrollo del grano, pero la mayoría se han enfocado en genes relacionados con diferentes tipos de estrés. El objetivo del presente estudio fue analizar la expresión transcripcional de genes relacionados con la síntesis de almidón y proteínas en genotipos de garbanzo de interés alimentario. Se seleccionaron dos genotipos tipo desi y dos kabuli. Se prepararon harinas de granos en desarrollo (20 y 30 días después de la antesis, DDA) y maduro a partir de las cuales se determinó el contenido y composición de almidón, así como los perfiles de proteínas de almacenamiento y proteínas asociadas al gránulo de almidón. También se extrajo ARN de granos en desarrollo para analizar la expresión transcripcional de genes de síntesis de almidón y proteínas mediante PCR tiempo real. Los contenidos de almidón (35.02-45.52 g/100 g harina) y amilosa (21.23-28.86 g/100 g almidón) variaron significativamente entre los genotipos estudiados. La enzima almidón sintasa unida al gránulo, responsable de la síntesis de amilosa, fue la proteína asociada al gránulo más abundante y su acumulación se correlacionó con el contenido de este polisacárido. Los perfiles de proteínas de almacenamiento

mostraron que las globulinas (legumina 11S y vicilina 7S) fueron las más abundantes en los genotipos, mientras que la fracción de albúminas presentó una mayor acumulación de lipoxigenasa en los genotipos desi durante el desarrollo del grano. La expresión de genes relacionados con la síntesis de amilopectina, enzima ramificadora de almidón (SBE) e isoamilasa 1 (ISA1), fue mayor en genotipos tipo kabuli que los desi a los 30 DDA, lo cual correspondió con un mayor contenido de amilopectina en estos genotipos. En general, se observó una mayor expresión de genes que codifican para lipoxigenasa y leguminas en los genotipos desi, los cuales a su vez presentaron una mayor acumulación de estas proteínas. Los resultados sugieren el uso potencial de estos genes para desarrollar marcadores moleculares para apoyar los programas de mejoramiento genético de garbanzo.

ABSTRACT

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is the second most important legume in the world and represents a good source of proteins and carbohydrates for human nutrition. The accumulation of these components changes during seed development and their contents in the mature seed usually show a wide variability associated with the genetic diversity of chickpea, which is useful in breeding programs. The analysis of gene expression in multiple chickpea genotypes represents a strategy to identify functional markers for traits of interest. However, transcriptomic studies in chickpea have been focused mainly on stress-related genes. The aim of this study was to determine the expression at the transcript and protein levels of genes encoding starch biosynthetic enzymes and storage proteins in chickpea genotypes. Flours were prepared from developing (20 and 30 days after anthesis, DAA) and mature seeds of two desi and two kabuli genotypes and then used to determine starch content and composition, storage protein profiles and starch granule-associated proteins (PAG). RNA was also extracted from developing seeds (20 and 30 DAA) to analyze the expression of genes encoding starch biosynthetic enzymes and storage proteins by qRT-PCR. Starch (35.0-45.5 g / 100 g flour) and amylose content (21.2-28.8 g / 100 g starch) varied significantly among the genotypes. Granule-bound starch synthase, the enzyme responsible for amylose synthesis, was the most abundant among the PAG and its accumulation correlated with amylose content. The storage protein profiles showed that globulins (legumin 11S and vicilin 7S) were the most abundant in all genotypes, whereas the albumins fraction showed greater accumulation of lipoxigenase in desi than kabuli genotypes during seed development. The genes encoding enzymes involved in amylopectin synthesis, starch branching enzyme

(SBE) and isomylase 1 (ISA1), showed higher expression in kabuli than desi genotypes and corresponded with the higher amylopectin content observed in these genotypes. In general, higher levels of transcripts and proteins were observed for lipoxygenase and legumins in desi genotypes. The results suggest the potential use of these genes to develop molecular markers to assist in chickpea breeding programs.

II INTRODUCCIÓN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es la segunda leguminosa en importancia como alimento en el mundo después de la soya, cultivándose en aproximadamente 57 países, principalmente en los países en desarrollo, con una producción mundial de 14,239,010 ton en el 2014; México ocupó el octavo lugar (FAOSTAT 2016), siendo Sinaloa el principal estado productor en ese mismo año (SAGARPA 2016).

La importancia de este grano se debe a que posee un alto valor nutritivo y nutracéutico en la dieta humana, ya que es una buena fuente de proteínas con buena composición de aminoácidos esenciales y alta biodisponibilidad (Newman y col 1987). Además contiene hidratos de carbono, cuyo principal componente es el almidón, caracterizado por tener un índice glucémico bajo que permite mantener fluctuaciones mínimas de los niveles de glucosa en sangre (Rizkalla y col 2002). Entre otros de sus componentes se encuentran fibra dietaria, ácidos grasos insaturados, minerales y vitaminas, así como compuestos fitoquímicos con actividades biológicas, entre los que destacan los compuestos fenólicos y carotenoides (Ladizinsky 1975; Chavan y col 1989).

Las características que le confieren al garbanzo su alto valor nutritivo son influenciadas por el genotipo y su interacción con el medio ambiente durante las etapas de desarrollo del grano (Borisjuk y col 2004; Weber y col 2005), presentándose cambios importantes en la biosíntesis y acumulación del almidón y las proteínas de almacenamiento. La identificación de genes relacionados con dichas características puede servir como fuente de mejora de la calidad del grano de este cultivo tan importante para el Noroeste de México.

El conocimiento y manejo de la diversidad genética es muy importante para cualquier programa de mejoramiento. En Sinaloa, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ha introducido y desarrollado nuevas variedades de garbanzo con características de interés agronómico como resistencia a plagas y enfermedades (Manjarrez y col 2003). Estos materiales presentan una amplia diversidad genética y variabilidad en características de interés alimentario como contenido de proteína y almidón (Quintero-Soto 2015), por lo que representan una fuente de mejora de estas características para darle mayor valor agregado a la producción de esta leguminosa. La identificación de genes o marcadores para su uso en el mejoramiento del garbanzo podría realizarse mediante el análisis transcripcional de genes candidatos en genotipos contrastantes en las características de interés. En este sentido, son pocos los estudios realizados del transcriptoma en leguminosas, de los cuales se han podido identificar genes que son clave en los procesos de desarrollo del grano (Garg y Jain 2013), así como otros relacionados con estreses de tipo biótico y abiótico (Mantri y col 2007; Varshney y col 2007) y no se conocen estudios sobre la expresión de genes implicados en características nutrimentales. Por ello, en el presente estudio se evaluaron los cambios en la expresión de genes relacionados con la síntesis de almidón y proteínas, ya que son los principales componentes responsables de las características nutrimentales en garbanzo.

III REVISIÓN DE LITERATURA

A GENERALIDADES DEL GARBANZO

1 Origen y taxonomía

Diversos estudios han sugerido que el origen del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) se sitúa en el sureste de Turquía, ya que en dicha región se ha observado la presencia de diferentes especies anuales silvestres fuertemente relacionadas con el garbanzo, como son *C. reticulatum* y *C. echinospermum*. También existen evidencias botánicas y arqueológicas que sugieren que el garbanzo fue domesticado en Medio Oriente y ampliamente cultivado en la India, Cuenca Mediterránea y en Etiopía desde la antigüedad, extendiéndose posteriormente hacia América y Australia. Se sabe que en Turquía, Irán, Afganistán y Asia Central es donde principalmente se encuentran las especies silvestres de *Cicer* (Ladizinsky 1975; Duke 1981). En Tell el-Kerkh, Siria, Asia, se han encontrado evidencias arqueológicas que apoyan la idea que la domesticación del garbanzo ocurrió alrededor de 10,000 años a.c., identificándose en dicha región 138 semillas/fragmentos de *Cicer arietinum* (11 completas, 65 medias y 62 fragmentos) (Tanno y Willcox 2006).

En cuanto a su llegada al Continente Americano, se considera que Cristóbal Colón introdujo el garbanzo a América en su segundo viaje y fue en Las Antillas donde los españoles realizaron los primeros cultivos para el establecimiento de dicha leguminosa, con resultados poco alentadores debido a las condiciones y factores climáticos desfavorables. Posteriormente, fue traído a México en donde sus condiciones ambientales favorecieron su rápida expansión, lo que permitió que se desarrollara con éxito, de tal forma que en pocos años se convirtió en un producto de

gran importancia comercial lo que originó que nuestro país lograra competir contra países como Turquía, Australia y España (ASERCA 1997).

Diversos estudios sugieren que *Cicer reticulatum* L. es el progenitor silvestre de la especie cultivada *C. arietinum* L., debido a que presentan muchas semejanzas morfológicas (Ladizinsky 1975; Ladizinsky y Adler 1976; Labdi y col 1996; Singh y O'Campo 1997). Además, *Cicer* es un género monofilético y posee baja variación genética, a pesar de su alta variabilidad morfológica (Abbo y col 2003).

Taxonómicamente, el garbanzo pertenece a la familia FABACEAE, subfamilia Papilionoides, tribu Cicereae, género *Cicer* (Cuadro 1), al cual corresponden 43 especies, 9 anuales y 34 perennes (Taylor y Ford 2007; Singh y col 2008), siendo *Cicer arietinum* L. la única especie domesticada, agronómica y económicamente importante (Crispín y López 1976). En la subfamilia Papilionoides se encuentran otras leguminosas importantes estrechamente relacionadas al garbanzo, como alfalfa (*Medicago sativa*), trébol (*Trifolium spp.*), chícharos (*Pisum sativum*) y lenteja (*Lens culinaris*) (Varshney y col 2013).

La especie *C. arietum* L. es diploide, es decir, contiene dos pares de cromosomas ($2n=2x=16$). Posee un tamaño de genoma de 740 Mbp, en el cual se han identificado unos 28,269 genes (Varshney y col 2013; ICRISAT 2016).

La planta de garbanzo (Figura 1A) es anual con una altura que varía entre 30 y 70 cm, habiendo tipos altos mayores de 1.0 m cultivados en la antigua Unión Soviética. El follaje está cubierto de pelos glandulares que secretan exudados altamente ácidos que confieren tolerancia a plagas de insectos, como es el barrenador de la vaina. Las hojas son compuestas, dispuestas en una forma alternada con 11 a 13 folíolos. Las flores son auxiliares, solitarias o en inflorescencia

Cuadro 1. Taxonomía del garbanzo (*Cicer arietinum* L.).

Categoría	
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)

A)



B)



C)



Figura 1. Partes aéreas de una planta de garbanzo. A. Planta con vainas e inflorescencias; B. Flores de genotipos kabuli; C. Flores de genotipos desi.

de dos o tres, de color blanco, rosa, púrpura o azul dependiendo del genotipo (Figura 1B, 1C). La planta cuenta con un sistema de raíces profundas y se considera un cultivo resistente. Produce nódulos en común con otras legumbres 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 2016).

El grano se presenta en vainas cuya longitud oscila entre 15 y 30 mm, el número de vainas suele variar de 20 a 150, con un número de semillas de una a tres por vaina (Figura 1A) (ICRISAT 2016), las cuales son globulosas, ligeramente aplastadas y lobuladas por un lado. Dependiendo de la variedad, los colores de la semilla pueden ser blanco, mate, crema, café, rojizo y negro; el tamaño de la semilla también varía ampliamente de grandes a pequeñas (Coronel-Elenes 1980). De acuerdo al cultivar, la forma del grano puede ser redonda, semi-redonda, arrugada, semi-arrugada y exalbuminosa.

Los genotipos de garbanzo generalmente se dividen en desi, los cuales se cultivan desde hace unos 5000 años en la India y regiones tropicales semiáridas, y kabuli, originarios de Medio Oriente y Mediterráneo, desarrollados por selección y mutación (Singh y O'Campo 1997). Los dos tipos se diferencian principalmente por el tamaño, forma y color del grano (Figura 2); los tipo desi tienen flores de color rosa (Figura 1C), pigmentación en los tallos y una cubierta de la semilla gruesa y de color oscuro, de tamaño pequeño y de forma angular (Figura 2A), mientras que los tipo kabuli presentan flores blancas (Figura 1B), carecen de pigmentación en los tallos, tienen semillas blancas o beige, de tamaño medio a grande, redondeadas, arrugadas y de superficie lisa (Figura 2B) (Moreno y Cubero 1978). El peso de la semilla varía generalmente de 0.1 a 0.3 g y 0.2 a 0.6 g en los tipos desi y kabuli, respectivamente



Figura 2. Granos de genotipos de garbanzo. A) Tipo desi; B) Tipo kabuli.

(Frimpong y col 2009). Además, se ha reportado una amplia variación en la composición química (contenido de proteína, lípidos y carbohidratos) debido a sus diferencias genotípicas (Singh y col 1992; Gil y col 1996; Wood y Grusak 2007).

2 Producción e Importancia económica

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es la segunda leguminosa en importancia como alimento en el mundo, cultivándose en aproximadamente 57 países, principalmente en los países en vías de desarrollo, los cuales contribuyen con más del 76 % de su producción mundial. En el año 2014 se obtuvieron 14,239,010 ton de garbanzo (Cuadro 2), siendo India el principal país productor con cerca del 69% de la producción total y el resto fue proporcionado por varios países entre los cuales se encuentran Australia, Pakistán, Turquía y México, ocupando nuestro país el octavo lugar con aproximadamente 171,000 ton en este mismo año (FAOSTAT 2016).

Por lo que respecta a la producción de garbanzo en México, la región Noroeste donde se ubica el estado de Sinaloa, es la zona productora más importante con aproximadamente 80% de la producción nacional, ocupando Sinaloa el primer lugar con aproximadamente 103,645 ton en el 2014 (Cuadro 3). Otros estados que destacan en la siembra de este cultivo son Sonora, Guanajuato y Michoacán (SAGARPA 2016).

En general, los garbanzos tipo kabuli se han considerado económicamente más importantes, ya que reciben mayor precio de mercado que el de tipo desi, esto debido a sus características agronómicas como es presentar semillas más grandes lo que genera un mayor rendimiento (Agarwal y col 2012).

Cuadro 2. Principales países productores de garbanzo (2014)

País	Producción (ton)
India	9,880,000
Australia	817,200
Pakistán	750,000
Myanmar	492,300
Etiopía	458,682
Turquía	450,000
Irán	275,310
México	171,665
Estados Unidos	127,369
Canadá	123,000
Otros países	693,484
Total	14,239,010

FAOSTAT (2016)

Cuadro 3. Principales estados productores de garbanzo en México (2014)

Estado	Producción (ton)
Sinaloa	103,645
Sonora	24,197
Guanajuato	20,458
Michoacán	10,950
Baja California Sur	9,563
Otros estados	2,852
Total	171,665
SAGARPA (2016)	

B COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GRANO DE GARBANZO

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es una buena fuente de carbohidratos, proteínas, vitaminas (tiamina, niacina, vitamina E) y minerales (Ca, Mg, Zn, Fe) (Uma-Reddy y Pushpamma 1986; Reyes-Moreno y col 2000), así como una fuente importante de fibra dietaria (Cuadro 4) (Wood y Grusak 2007). Además, contiene una reserva de metabolitos secundarios y componentes bioactivos, lo cual hace que esta leguminosa pueda considerarse como un alimento funcional cuya ingesta favorece el control y prevención de varias enfermedades crónicas en seres humanos (Fратиanni y col 2014).

1 Carbohidratos

El garbanzo contiene entre 50.0 y 70.9 % de carbohidratos, siendo el almidón el constituyente principal. Además, contiene alrededor del 8.0 % de fibra cruda (Chavan y col 1989). Por ser el almidón el componente mayoritario, en la siguiente sección se describe con mayor detalle.

a Almidón

En plantas, el almidón es acumulado en diferentes tejidos, durante el día es acumulado en las células de las hojas y desplazado durante la noche a los tejidos de reserva. En leguminosas el almidón es almacenado en los cotiledones del grano (Buléon y col 1998). En garbanzo, el contenido de almidón en el grano entero varía de 36 a 53% (Quintero-Soto 2015; Milán-Noris y col 2016), mientras que en el grano descascarado va de 55.3 a 58.1% (Singh 1985; Chavan y col 1989).

Cuadro 4. Composición química del grano de garbanzo.

Parámetro	Tipo desi		Tipo kabuli	
	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.
Proteína ^a	16.70	30.67	12.60	29.00
Cenizas ^a	2.04	4.20	2.00	3.90
Lípidos ^a	2.90	7.42	3.40	8.83
Ac. Linoleico(18:2) ^d	45.95	61.50	16.40	70.40
Ac. Linolénico (18:3) ^d	2.16	4.80	0.30	3.30
Carbohidratos total ^a	50.64	64.90	54.27	70.90
Almidón ^a	32.00	56.30	30.00	57.20
Amilosa ^b	20.00	41.00	23.00	47.00
Azúcares solubles ^a	5.33	11.80	6.65	7.50
Azúcares totales ^a	2.20	10.70	5.50	10.85
Fibra cruda ^a	3.70	13.00	1.17	4.95
Fibra dietaria ^a	18.40	22.70	10.60	16.63
Vitaminas				
Tiamina ^c	-	0.48	-	0.59
Niacina ^c	-	1.54	-	1.76
Vitamina E ^c	-	0.82	0.82	13.7
Minerales				
Calcio ^c	68.0	269	103	259
Magnesio ^c	107.4	168	119	167
Zinc ^c	2.2	20.00	2.0	5.4
Hierro ^c	3.0	9.8	3.0	9.8

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

Wood y Grusak (2007)

Dependiendo del tipo de garbanzo, el contenido de almidón puede variar ocupando de un 32 a 56% del peso del grano en los desi y de 30 a 57% en los tipo kabuli (Cuadro 4) (Wood y Grusak 2007).

Debido a que el almidón es el principal carbohidrato en la nutrición humana, éste se clasifica de acuerdo a su grado de digestión en base a la tasa de glucosa liberada durante su hidrólisis por enzimas digestivas: en almidón de rápida digestión, de digestión lenta y almidón resistente, teniendo este último un impacto positivo en la salud humana (Güzel y Sayar 2010). Aproximadamente el 35% de almidón total de garbanzo ha sido considerado como almidón resistente y el 65% restante como almidón disponible (Aguilera y col 2009a; Aguilera y col 2009b), aunque se han observado diferencias considerables entre los cultivares de garbanzo (Jood y col 1988; Hoover y Ratnayake 2002; Singh y col 2004; Huang y col 2007; Milán-Noris y col 2016), las cuales pueden ser debidas a factores ambientales o genéticos.

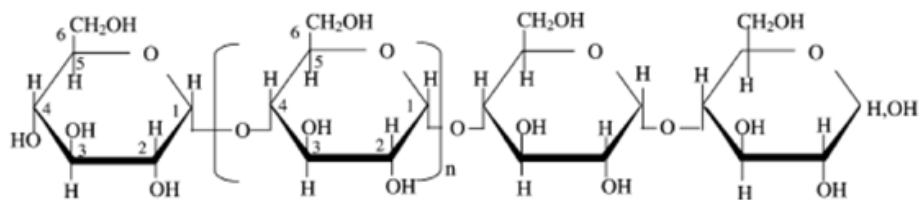
Los almidones de leguminosas se digieren lentamente a diferencia de los de cereales, por lo que la digestibilidad depende de la fuente de almidón, el tamaño del gránulo, la relación amilosa-amilopectina, la cristalinidad, la estructura molecular de la amilopectina y los poros de la superficie (Hoover y Sosulski 1991; Jane y col 1997; Zhang y col 2006; Sandhu y Lim 2008). Además, los almidones de leguminosas tienen un índice glucémico bajo, lo que ayuda en el control de la diabetes, así como en enfermedades arteriales (Jenkins y col 1982); también se conoce que se fermentan en el intestino grueso para producir ácidos grasos de cadena corta (Sandhu y Lim 2008) que son beneficiosos para el buen funcionamiento del colon.

1) Estructura química

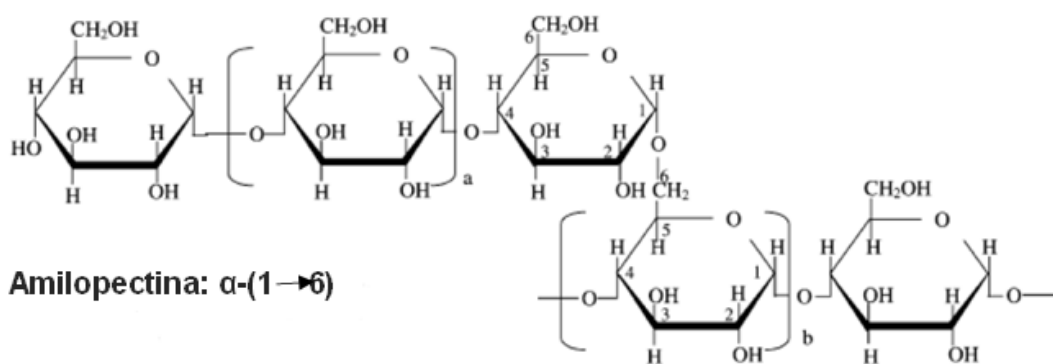
En las plantas el almidón es el principal carbohidrato de reserva y es depositado en forma de gránulos, cristalinos, cuya morfología, composición química y estructura molecular son características particulares de cada especie de planta. La funcionalidad del almidón se debe a la amilosa y amilopectina, principales componentes de alto peso molecular (Figura 3), así como a la organización física de estas macromoléculas en la estructura granular (James y col 2003). La amilosa y la amilopectina representan aproximadamente el 98-99% del peso seco del gránulo de almidón y normalmente se encuentran en una proporción que puede variar dependiendo de la especie, variedad, etapa de desarrollo y las condiciones ambientales del cultivo (Shannon y Garwood 1984). El almidón de garbanzo contiene alrededor de 20-40% de amilosa (Hughes y col 2009) y 60-80% de amilopectina.

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) (Figura 3) (Zeeman y col 2007).

En lo referente a los gránulos de almidón, análisis de microscopía electrónica han mostrado que el tamaño de estos varía de 6 a 31 μm en garbanzo (Hoover y Ratnayake 2002; Singh y col 2004). Además, se ha observado que la mayoría de los gránulos son de forma ovalada, aunque también se han encontrado de forma esférica y redonda (Colonna y col 1982). Estudios de microscopía electrónica, difracción de rayos X y análisis de dispersión indican que los gránulos de almidón son semicristalinos y poseen anillos concéntricos con laminillas cristalinas y amorfas



Amilosa: α -(1 $\rightarrow$ 4)



Amilopectina: α -(1 $\rightarrow$ 6)

Figura 3. Estructura química de amilosa y amilopectina.

Adaptada de Tester y Karkalas (2002)

alternadas con una distancia de repetición de 9 nm (Trethewey y Smith 2000). La distribución de la amilosa dentro de los anillos concéntricos difiere entre el centro y la periferia del gránulo, ya que sólo ocupa los lugares disponibles que deja la amilopectina después de sintetizarse (Tetlow y col 2004a).

El nivel de organización del gránulo de almidón se debe principalmente a las moléculas de amilopectina. Este polímero es el más abundante en el almidón y una característica del mismo, es su alto número de ramificaciones. Las regiones con altas ramificaciones se alternan con regiones que carecen de ellas; esta arquitectura es la responsable de la naturaleza semicristalina de los gránulos de almidón (James y col 2003). La amilopectina contiene cadenas lineales de diversas longitudes, las cuales se describen en términos de cadenas A, B y C (Peat y col 1952). La cadena exterior A presenta glucosas unidas por enlaces α -(1,4) y la reducción de glucosa en el C₆ por la unión a una cadena interior B, tales cadenas poseen uniones por enlaces α -(1,4) y α -(1,6), llevando las otras cadenas como ramificaciones. La cadena C de igual manera lleva ramificaciones, pero es la que contiene el único residuo terminal reductor (Manners y Matheson 1981); aproximadamente el 5 % de unidades de glucosa en la amilopectina están unidas por el enlaces glucosídicos α -1,6 introduciendo ramificaciones a la cadena (James y col 2003).

Cuando los gránulos son observados bajo la luz polarizada, se observa una cruz oscura característica debido a la distorsión de la luz causada por la cristalinidad (birrefringencia) (French 1984). La cristalinidad dependerá probablemente de factores genéticos o ambientales durante el crecimiento de la planta (Hizukuri y col 1997).

2) Biosíntesis de almidón

En leguminosas la biosíntesis de almidón se lleva a cabo en los cotiledones. La Figura 4 muestra una visión general de la síntesis de este polisacárido, la cual se lleva a cabo por medio de la acción coordinada de múltiples enzimas de síntesis, así como de enzimas involucradas en su degradación (Tetlow y col 2004b). Dentro de estas enzimas se encuentran la ADP-Glucosa pirofosforilasa (AGPasa), almidón sintasas (GBSS, SS), enzimas ramificadoras de almidón (SBE) y enzimas desramificadoras de almidón (DBE).

El catabolismo de la sacarosa en el citosol y mitocondria produce glucosa-6-fosfato y ATP, sustratos para la biosíntesis de almidón, los cuales son trasladados al interior del amiloplasto y convertidos a glucosa-1-fosfato por la acción de la enzima fosfoglucomutasa. Posteriormente, la glucosa-1-fosfato es convertida a ADP-Glucosa (ADP-Glu) mediante la enzima AGPasa, considerándose éste el paso regulatorio que controla el flujo de carbono hacia la biosíntesis de almidón. Esta enzima consiste en pares de subunidades pequeñas (SS o α) y grandes (LS o β), constituyendo de este modo una estructura heterométrica (α_2 , β_2) (Seferoglu y col 2013). Estas dos subunidades están codificadas por dos genes distintos (Okita y col 1990; Nakata y col 1991; Smith-White y Preiss 1992), teniendo diferentes funciones en la actividad de la enzima (Okita y col 1990); se ha demostrado que la subunidad pequeña presenta actividad catalítica y reguladora, mientras que la subunidad grande es la responsable de la regulación alostérica de la subunidad pequeña (Ballicora y col 1995; Greene y col 1996), siendo esencial para el funcionamiento de la enzima.

Mutaciones en genes que codifican para las subunidades pequeña y grande de la enzima AGPasa en maíz (SH2 y BT2) y en chícharo (Rb) han mostrado

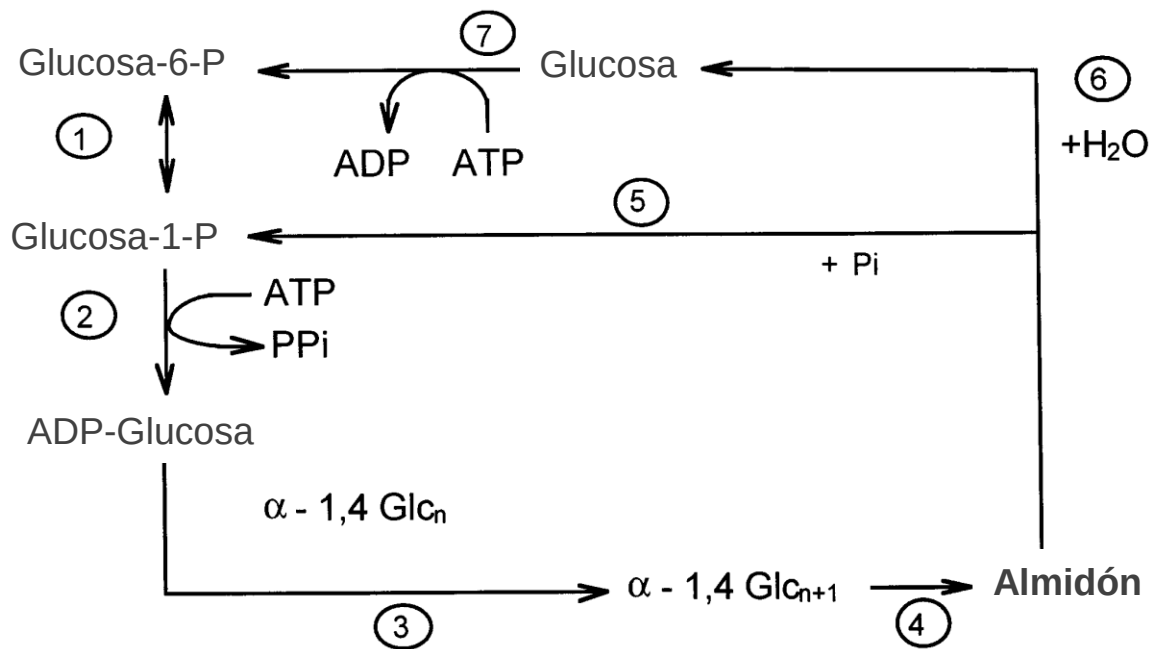


Figura 4. Esquema general de la biosíntesis de almidón. (1) Fosfoglucomutasa; (2) ADP-glucosa pirofosforilasa; (3) Almidón sintasas solubles y unidas a gránulos de almidón; (4) Enzimas ramificadoras; (5) Almidón fosforilasa; (6) Amilasas, enzimas desramificadoras, maltasas; (7) Hexoquinasa.

Adaptada de Buléon y col (1998)

reducciones en la actividad de dicha enzima y como resultado menos contenido de almidón (Müller-Rober y col 1992; Okita 1992). Esta relación observada entre la actividad de la AGPasa y la acumulación de almidón, se ha tomado como evidencia para sugerir que dicha enzima controla la velocidad de síntesis de almidón.

Las enzimas almidón sintasas (SS) añaden una unidad de glucosa del precursor ADP-Glu al extremo no reductor de una cadena de glucosas unidas por enlaces α -(1,4) para sintetizar los polímeros insolubles, amilosa y amilopectina. Una gran cantidad de isoformas de almidón sintasas han sido identificadas en el endospermo de cereales (Jeon y col 2010), las cuales se pueden dividir en dos grupos principales, uno de ellos involucrado principalmente en la biosíntesis de amilosa, y el segundo grupo limitado a la biosíntesis de amilopectina.

El primer grupo de genes de almidón sintasas incluye almidón sintasas unidas al gránulo I y II (GBSSI y GBSSII). La enzima GBSSI funciona especialmente en la elongación de la amilosa, mientras que la GBSSII, codificada por otro gen, es la responsable de la síntesis de almidón en hojas y otros tejidos que no son de reserva, los cuales acumulan almidón de manera transitoria (James y col 2003).

El segundo grupo de genes de almidón sintasas, designadas SSI, SSII, SSIII y SSIV, está involucrado exclusivamente en la síntesis de las cadenas de amilopectina y se encuentran asociadas a los gránulos de almidón (Zeeman y col 2010).

Las enzimas ramificadoras de almidón (SBE) también están presentes en múltiples isoformas. Estas enzimas generan los enlaces α -(1,6) rompiendo los enlaces α -(1,4) y transfiriendo la cadena al C₆ de un residuo de glucosa de otra cadena formando la estructura ramificada de la molécula de amilopectina. Se ha observado que en los embriones de chícharo, una reducción en la actividad de esta

enzima causada por una mutación en el locus *r*, reduce la velocidad de síntesis de almidón (Burton y col 1995).

Las enzimas desramificadoras de almidón (DBE) catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -(1,6). Existen dos tipos de enzimas DBE en plantas superiores y se definen sobre la base de sus especificidades de sustrato: enzimas desramificadoras tipo isoamilasa y tipo pululanasa (James y col 2003). La DBE tipo isoamilasa rompe las ramificaciones de amilopectina y fitoglucógeno, y está dividida en tres isoformas (ISA1, ISA2 y ISA3), mientras que la tipo pululanasa actúa sobre pululanos y amilopectina pero no fitoglucógeno.

Algunos estudios sugieren que ISA2 carece de actividad catalítica debido a la falta de residuos catalíticos, y que ISA1 y ISA2 forman un complejo heteromultimérico, mientras que ISA3 parece ser una enzima monomérica (Hussain y col 2003).

Se ha propuesto que las enzimas DBE pueden ser las responsables de la remoción de ramificaciones mal posicionadas (pre-amilopectina) generadas en la superficie de los gránulos de almidón en desarrollo, lo cual pudiera, prevenir la cristalización (Tetlow y col 2004a).

Cabe señalar que las isoformas que presentan cada una de estas enzimas (GBSS I y II; SSS I, II, III y IV; SBE I y II, que a su vez pueden ser del tipo “a” o “b”), difieren en el mecanismo de acción durante la síntesis del almidón, generando estructuras que difieren en el grado de polimerización de las cadenas lineales, en la densidad y en la longitud de las ramificaciones; estas isoformas pueden o no, estar asociadas al gránulo del almidón (Agama-Acevedo y col 2013).

Además del usual proceso de regulación de las enzimas biosintéticas del almidón, el estrés abiótico también afecta la cinética del metabolismo, de manera que el balance de los factores ambientales influye en la acumulación final de almidón en los órganos de almacenamiento (Muñoz y col 2006). A su vez, dependiendo de la etapa de desarrollo de dichos órganos, puede variar la biosíntesis del almidón (Shannon y Gargwood 1984). Li y col (2007) midieron el contenido de almidón, amilosa y el tamaño del gránulo de almidón durante el desarrollo del grano de maíz, encontrando cambios importantes en los primeros días después de la polinización, disminuyendo estos cambios a medida que el grano maduraba, indicando que el desarrollo de los gránulos de almidón es paralela al desarrollo de los granos. También se ha observado que la expresión de genes de síntesis en algunas leguminosas es mayor en semillas en etapas de desarrollo avanzadas (Shannon y Garwood 1984; Pérez-Grau y Goldberg 1989; Hauxwell y col 1990).

2 Proteínas

El garbanzo representa una fuente barata de proteínas de gran potencial, que además pueden tener un aprovechamiento integral, incluso a nivel de subproductos. La composición de dichas proteínas en aminoácidos esenciales, 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; Gatel y Champ 1998).

Las leguminosas acumulan proteínas a lo largo de su desarrollo, por lo tanto, semillas maduras contienen normalmente valores altos de proteínas. El garbanzo

presentan un amplio rango de proteína total, el cual puede variar dependiendo del tipo de garbanzo, con un contenido de 16 a 30% para los desi, y 12 a 29% para los tipo kabuli (Cuadro 4), asimismo estos porcentajes pueden varían dependiendo de la especie, estado de madurez y condiciones de cultivo. También, se han reportado actividades biológicas en estudios realizados en hidrolizados de proteínas de garbanzo, entre las que se incluyen actividad antifúngica y actividad antioxidante (Yust y col 2003; Torres Fuentes y col 2011; Zhang y col 2011).

Las proteínas de reserva del grano de garbanzo han sido fraccionadas en base a su solubilidad: en globulinas, las cuales son solubles en soluciones salinas; en glutelinas, solubles en ácidos o álcalis; en albúminas, solubles en agua; en prolaminas, solubles en alcohol y el resto es considerada proteína residual (Singh y Jambunathan 1982).

a Globulinas

Las globulinas representan alrededor del 50 % de las proteínas del grano, pudiendo representar hasta el 80 % de éstas; son típicamente almacenadas en cuerpos proteínicos y se componen de dos grandes grupos: Legumina 11S y vicilina 7S (Casey y col 1993).

La legumina 11S es codificada por una pequeña familia de genes y es la proteína de almacenamiento predominante en las semillas de dicotiledóneas, pudiendo llegar a representar el 46 % de la proteína total (Tavano y Neves 2008). Esta proteína cuenta con dos polipéptidos α y β . Poseen una estructura oligomérica integrada por seis subunidades que interaccionan 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) cuyo peso molecular es de 37-40 kDa y uno básico (β) de 24-27 kDa, los cuales están unidos por un enlace disulfuro (Sánchez-Vioque y col 1999).

La vicilina 7S es una proteína de reserva que puede llegar a representar el 12 % de la fracción de globulinas, tiene un peso molecular de aproximadamente 136 kDa y está compuesta al menos de siete polipéptidos en el intervalo de 12.4 a 67 kDa (Tavano y Neves 2008). 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 postraducciona del tipo proteolítico y glicolítico, se convierte en subunidades cuyo tamaño varía considerablemente. Este comportamiento se ha observado en las subunidades de vicilina del chícharo, las cuales se sintetizan inicialmente como polipéptidos de 47 a 50 kDa, y después del procesamiento postraducciona se convierten en subunidades de 12 a 33 kDa (Casey y col 1993).

b Glutelinas

El garbanzo es una de las pocas leguminosas que contienen glutelinas, las cuales pueden llegar a representar hasta el 18.1 % del peso, este contenido relativamente alto en garbanzo es único para semillas de leguminosas (Chang y col 2012). Estas proteínas estructuralmente son similares a las globulinas y pertenecen a la familia de las globulinas 11S (Shotwell y col 1988; Takaiwa y col 1999).

c Albúminas

La fracción de albúminas representa del 15 al 25 % de las proteínas, ya que incluyen la mayor parte de las proteínas enzimáticas y metabólicas (Casey y col 1993). Estas se encuentran distribuidas en el citoplasma. La mayor parte de las proteínas de albúmina tienen alguna función fisiológica, tales como las actividades enzimáticas de las lipoxigenasas, glicosidasas, o proteasas implicadas en la degradación de proteínas de almacenamiento. Otras albúminas, como inhibidores de proteasas o lectinas, están implicadas en mecanismos de defensa (Gueguen 1991). Tavano y Neves (2008) informaron que la actividad del inhibidor de tripsina es más concentrada en la fracción de albúmina que en la fracción de globulina. Estas proteínas son de importancia nutricional debido a su alto contenido de lisina y aminoácidos azufrados (Bhatty 1982; Murray y Roxburgh 1984).

La lipoxigenasa (linoleato: oxígeno oxidorreductasa) 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, entre los más comunes se encuentran a 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. Estos hidroperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados actúan como intermediarios para un gran número de rutas metabólicas divergentes. Tal es el caso de la co-oxidación de pigmentos, ya que para que ocurra se necesita la presencia tanto de la enzima como del ácido graso (Sanz 1992).

Entre la amplia gama de proteínas que se encuentran en albúminas, dos son las más abundantes y se han descrito en chícharo como la albúmina PA2 y PA1 o albúmina 2S (Casey y col 1993). PA2 es un homodímero considerado como una lectina capaz de aglutinar eritrocitos humanos, presente en chícharos y garbanzos (Vioque y col 1998). PA1 se definió inicialmente como un grupo sobre la base de su coeficiente de sedimentación de aproximadamente 2 (Youle y Huang 1981), por lo tanto, se denominó como albúmina 2S; su peso molecular es de aproximadamente 20 kDa y se compone de dos polipéptidos cuyos pesos son 10 y 12 kDa (Vioque y col 1999). La principal función de la albúmina 2S es de proteína de almacenamiento, pero debido a su alto contenido de cisteína y su peso molecular bajo, se sugiere que posee actividad biológica como inhibidora de proteasas y como proteína de defensa (Svendsen y col 1994).

d Prolaminas

Las prolaminas son las proteínas que se encuentran en menor proporción en el garbanzo, representando solamente el 2.8 % de la proteína total (Chavan y col 1989). Son cadenas polipeptídicas monoméricas con pesos moleculares entre 30 y 80 kDa, además son ricas en los aminoácidos prolina y glutamina (Eckert y col 2010).

3 Lípidos

El grano de garbanzo cuenta con un contenido relativamente alto de grasas en comparación con otras leguminosas (Pittaway 2006). Su contenido se encuentra en un rango de 2.90 a 7.42 % en el garbanzo tipo desi y de 3.40 a 8.83 % para tipo kabuli (Cuadro 4). Contiene ácidos grasos como el ácido oleico, encontrándose en

mayor proporción en los garbanzos tipo kabuli; además esta leguminosa posee ácidos grasos poliinsaturados (linoleico y linolénico) esenciales para los seres humanos, los cuales representan aproximadamente un 65 % de los lípidos totales (Wood y Grusak 2007). Los granos de garbanzo tipo desi contienen de 46-62 % de ácido linoleico, mientras que en los kabuli se encuentra en un rango de 16-70 %. En cuanto al ácido linolénico, su contenido varía de 2-5 % y 0.3-3 % para desi y kabuli, respectivamente.

4 Compuestos fitoquímicos

El garbanzo posee compuestos fitoquímicos considerados como nutraceuticos, es decir, que proveen beneficios a la salud incluyendo la prevención y tratamiento de enfermedades; entre dichos compuestos se tienen los que poseen actividad antimutagénica, anticarcinogénica y antioxidante (Defelice 1995; Liu 2004).

Diversos estudios han señalado que los fitoquímicos poseen capacidad para prevenir enfermedades cardiovasculares, formación de tumores, hipercolesterolemia en sangre y otros desórdenes crónicos (Ruíz y col 2008). Dentro los compuestos fitoquímicos se tienen los fenólicos, tales como flavonoides y catequinas, fitoestrógenos, como isoflavonas y lignanos, glucosinolatos, fitoesteroles, terpenoides y saponinas, además de carotenoides (Kalogerolopoulos y col 2010; Pennington y Fisher 2010).

En relación a los carotenoides, se tienen dentro de los más importantes a luteína, β -criptoxantina, β -caroteno, α -caroteno y licopeno (Buzzini 2001). 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). El garbanzo

contiene aproximadamente 49 μg de β -caroteno por cada 100 g de harina (Atienza y col 1998). La luteína y la zeaxantina están presentes en la mácula de la retina, los cuales son efectivos contra la degradación macular relacionada con la edad (Meydani 2001). Abbo y col (2005) reportaron que los carotenoides luteína y zeaxantina, se encontraban en mayor proporción en garbanzo observando valores promedio de luteína de 0.28 y 0.62 mg/100 g en tipos kabuli y desi, respectivamente; de igual manera, para zeaxantina se observaron valores de 0.16 mg/100 g para kabuli y 0.23 mg/100 g para desi, y en menor proporción β -caroteno, α -caroteno y β -criptoxantina.

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; Amarowicz y Pegg 2008). El contenido de compuestos fenólicos reportado en garbanzo presenta una amplia variabilidad, lo cual se puede atribuir principalmente al genotipo utilizado, al color de la testa y al método empleado para su determinación. En garbanzo tipo kabuli, Xu y Chang (2007) reportaron un contenido de fenólicos totales de 154 mg EAG/100 g muestra bs, mientras que Han y Baik (2008) observaron un contenido de 220 mg EAG/100 g muestra bs. En garbanzo tipo desi, Kalogeropoulos y col (2010) reportaron un contenido de fenólicos de 61.93 mg EAG/100 g muestra bs, mientras que Segev y col (2010) y Heiras-Palazuelos y col (2013) reportaron rangos de 150-680 mg EAG/100 g muestra bs y 123-151 mg EAG/100 g muestra bs, respectivamente.

C MEJORAMIENTO Y VARIABILIDAD GENÉTICA DEL GARBANZO

Las leguminosas constituyen una fuente importante de nutrientes en la dieta, por lo que se llevan a cabo considerables trabajos de mejoramiento para la promoción de su rendimiento y mejorar su calidad nutricional. En el caso particular del garbanzo, su potencial de rendimiento parece ser mayor que el logrado actualmente por los agricultores debido a las problemáticas que presenta su cultivo.

Tradicionalmente, durante el proceso de domesticación de la mayoría de los cultivos no se consideró como criterio de selección la capacidad de los genotipos para soportar las exigencias causadas por las condiciones abióticas adversas, por lo cual, la capacidad de ajuste o tolerancia de las plantas domesticadas a estas condiciones es limitada (Grover y col 2001). Debido a lo anterior, se han utilizado herramientas genómicas en los programas de mejoramiento en busca de disminuir el efecto de las condiciones ambientales (Tofiño y col 2007).

En los últimos años, se han llevado a cabo programas de mejoramiento con la finalidad de generar nuevas variedades con mayor rendimiento y buena estabilidad productiva, así como con semillas grandes y de alta calidad, resistencia al estrés abiótico y biótico, y una estructura de la planta adaptada para la recolección mecánica (Crinò 1987; Singh 1990, 1997). Dicho potencial solo puede explotarse plenamente, si se cuenta con una gran diversidad de materiales genéticos que permita seleccionar o mejorar características específicas. El banco de germoplasma del Instituto Internacional de Investigación de Cultivos para Zonas Tropicales Semiáridas (ICRISAT) tiene la mayor colección de garbanzo con 20,267 accesiones de 60 países, de las cuales 4,153 accesiones se obtuvieron de 65 misiones de recolección en 15 países y los restantes de donaciones de 19 países. Dentro de

dicha colección se incluyen 308 accesiones de 18 especies de *Cicer* silvestres (8 anuales y 10 perennes), de éstas 233 fueron donaciones de seis países y el resto (75) se obtuvieron de Afganistán, Turquía, Siria y Pakistán (Upadhyaya y col 2011). Algunos de las accesiones fueron donadas por el Centro Internacional de Investigaciones Agrícolas en Zonas Áridas (ICARDA) ubicado en Alepo, Siria, el cual además posee su propio banco de germoplasma.

Debido a la introducción y evaluación de germoplasma de ICRISAT e ICARDA, se lograron detectar genotipos con resistencia a la “rabia”, enfermedad ocasionada por hongos del género *Fusarium*, lo que ha permitido la generación de genotipos de garbanzo con resistencia a dicho patógeno.

En la región Noroeste de México, específicamente en el del estado de Sinaloa a través del Instituto Nacional de Investigadores Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), se han realizado estudios para identificar fuentes de resistencia y transferirla a variedades de interés comercial mediante mejoramiento clásico.

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 mejor rendimiento, calidad, y resistencia al ataque de *Fusarium*, misma que se introdujo de garbanzo forrajero. Con el trabajo de INIFAP mediante genética clásica, 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.

La biología molecular es una de las herramientas más utilizadas para estudiar las bases genéticas de la variación natural de caracteres complejos involucrados en la aptitud, adaptación al ambiente y evolución de las poblaciones; asimismo ha permitido 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. Dicha variabilidad genética se puede analizar empleando marcadores moleculares neutros o de ADN (ácido desoxirribonucleico) y asociando el genotipo de estos marcadores con la variación fenotípica del carácter de interés apoyándose de un análisis estadístico.

Cabe señalar que los marcadores moleculares corresponden a cualquier gen, cuya expresión permite un efecto cuantificable u observable como serían las características fenotípicas, por lo que dicho efecto podría 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. Es importante resaltar que un marcador molecular se considera como marcador genético si se transmite según las leyes básicas de la herencia mendeliana. Los marcadores moleculares se dividen en bioquímicos y de ADN. Dentro de los marcadores bioquímicos se incluyen a las proteínas y las isoenzimas o aloenzimas, y constituyen la primera generación de marcadores moleculares (Tanksley 1983).

Para evaluar la diversidad genética molecular se recomienda el uso de marcadores de ADN entre los que se tienen a los RFLP (Polimorfismo en el tamaño de fragmentos de restricción), RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), AFLP

(Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados), SSR (Repetición de secuencias sencillas), entre otros.

El conocimiento y manejo de la diversidad genética es muy importante para cualquier programa de mejoramiento. Los marcadores han sido de gran utilidad para establecer relaciones genéticas entre especies del género *Cicer* (Shan y col 2005). La mayoría de estos trabajos han reportado una gran diversidad en materiales silvestres de dicho género, pero una variación más limitada en garbanzo cultivado.

La introgresión de genes de la especie silvestre se puede controlar de manera efectiva con el uso de marcadores moleculares, lo que acelera la transferencia de rasgos de importancia agronómica en las bases genéticas deseables para el desarrollo de variedades con resistencia duradera a través de selección asistida por marcadores (Singh y col 2008).

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 hacia la búsqueda y desarrollo de marcadores moleculares asociados con estas características. Varios estudios se han encaminado a descubrir y caracterizar un gran número de microsatélites en garbanzo (Sethy y col 2006; Varshney y col 2007). El polimorfismo encontrado con estos marcadores ha permitido el desarrollo de mapas genéticos que son útiles para la identificación de genes asociados con algunos caracteres de interés agronómico como resistencia a estrés y el control de enfermedades fúngicas importantes (Abbo y col 2003; Singh y col 2008), destacando la enfermedad de la rabia causada por el hongo *Fusarium*. Sin embargo, se requieren más estudios en estos materiales para identificar marcadores moleculares asociados con otras características de interés agroalimentario, funcionales,

nutricionales y nutraceuticas, como es el caso de contenido de proteína y almidón, para darle un valor agregado a la producción de garbanzo y expandir su mercado. En este sentido, el análisis transcripcional de genes específicos en diferentes individuos permite inferir sobre patrones específicos, los cuales pueden ser relevantes al relacionarse con una característica de interés.

Herramientas de alto rendimiento de la genómica funcional han cambiado la investigación biológica y tienen gran impacto en la reproducción de plantas que evoluciona gradualmente la mejora de los cultivos (Varshney y col 2005). Las nuevas tecnologías prometen resolver las limitaciones en la definición de las asociaciones entre las secuencias de genes específicos y fenotipo. Como resultado, se ha desarrollado el concepto marcadores de expresión, que se centra en el establecimiento de las llamadas huellas dactilares de expresión, es decir, patrones específicos de todos los genes que responden a una característica (Singh y col 2008).

D EXPRESIÓN DE GENES EN LEGUMINOSAS

A nivel celular la información genética cifrada en el ADN y contenida en los genes se expresa a través de los mecanismos de transcripción y traducción, a partir del cual se producen moléculas de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y proteínas, respectivamente. La transcripción es un proceso nuclear cuya activación depende de estímulos intra o extracelulares que activan cascadas de señalización para determinar cuáles genes deben expresarse o reprimirse de acuerdo con el tipo de estímulo inicial (Soto-Sedano y Lopez-Carrascal 2012). En las células vegetales las rutas de transducción de señales normalmente afectan la transcripción de genes.

Las modificaciones en la transcripción pueden llevarse a cabo mediante activación e inhibición de las secuencias de reconocimiento en los promotores por la actividad de factores de transcripción, modificaciones en la cromatina, empalme del ARNm y cambios en la estabilidad del ARNm. El proceso de traducción también está influenciado por la dinámica de transducción de señales, a través de modificaciones postranscripcionales, tráfico intracelular, degradación de enzimas, alteraciones de la actividad enzimática o la señalización hormonal (Tofiño y col 2007).

La cantidad de moléculas producidas de determinado ARNm depende de la función que éste tenga en un proceso celular específico. Así, cuando se requiera dar respuesta a una condición determinada en la cual un gen tiene una participación importante, más moléculas de este transcrito se producirán. De forma similar, bajo ciertas circunstancias particulares hay genes que permanecen apagados, pero un estímulo hace que se expresen y se inicia entonces la transcripción. De esta manera la determinación de dónde, cómo y cuándo es generado un transcrito, bajo una condición dada, es fundamental para el entendimiento de la actividad biológica de un gen. Más aún, los niveles de ARNm pueden dar no solamente una visión clara de patrones de expresión, sino también cuantificaciones altamente correlacionadas entre cambios en la abundancia de ARNm con cambios en la abundancia de proteínas (Lockhart y Winzeler 2000). En conjunto, todos los transcritos derivados de genes que se producen en una célula en un momento y bajo una condición fisiológica determinada se denomina transcriptoma. La información sobre los transcriptomas de individuos permite inferir sobre patrones específicos de expresión de alelos, los cuales pueden ser relevantes hacia una característica (Guo y col 2004; Tirosh y col 2009).

1 Principales técnicas utilizadas en el análisis del transcriptoma

En la década de los noventa, los Northern blots, los microarreglos de ADNc (ADN complementario obtenido por transcriptasa inversa a partir de ARNm), los ADNc-AFLP y el análisis serial de expresión de genes SAGE (del inglés serial analysis of gene expression), entre otras técnicas, permitieron el desarrollo y generación de conocimiento en transcriptómica, al estudiar la expresión de genes relacionados con respuestas a estímulos o a condiciones particulares, así como para determinar cambios en los patrones de expresión génica en tratamientos y cinéticas de expresión (Shalon y col 1996; Schena y col 1998; Meyers y col 2004; Marguerat y Bahler 2010). Sin embargo, estas estrategias resultan limitantes al estar basadas en hibridación, tener baja cobertura y en algunos casos necesitar algún conocimiento previo de la secuencia del genoma para su implementación (Ward y col 2012).

En la actualidad otro método utilizado y preferido debido a su mayor sensibilidad, especificidad y rango dinámico amplio es la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qRT-PCR), donde el ARNm es copiado a ADNc generándose un intermediario de doble cadena por la reacción de transcripción reversa y posterior amplificación de la cadena por la reacción de la polimerasa (Freeman y col 1999; Gachon y col 2004). En este método los niveles de detección han aumentado significativamente mostrando en tiempo real la duplicación exacta del material inicial en la reacción de PCR por la incorporación de fluoróforos a la doble cadena naciente, lo que permite detectar cambios de dos órdenes de magnitud comparado con los geles de bromuro de etidio que manifiestan cambios de diez órdenes de magnitud (Barrero 2005). Además, qRT-PCR requiere la normalización de un gen de control expresado en niveles constantes en todas las condiciones

experimentales que se analizan, para la obtención de resultados precisos y fiables (Garg y col 2010).

2 Estudios de expresión transcripcional en leguminosas

Con la finalidad de encontrar las posibles mejoras en la calidad nutricional, así como de características agronómicas, es necesario tener una clara comprensión sobre los mecanismos regulatorios que intervienen en el proceso de desarrollo de las semillas, lo cual puede lograrse a través del estudio del transcriptoma. Dicho estudio permite la identificación a gran escala de ARNm, proporcionando información sobre las bases moleculares de los genes y rutas implicadas en los procesos de desarrollo.

El transcriptoma completo de garbanzos silvestres ha sido secuenciado usando altas tecnologías de secuenciación (Garg y col 2011; Jhanwar y col 2012). Los estudios han sido enfocados hacia la identificación y caracterización de algunos genes relacionados al estrés (Mantri y col 2007; Varshney y col 2007), existiendo la necesidad de obtener recursos genómicos de diversos genotipos de garbanzo y variaciones genéticas relacionadas a características nutrimentales y nutracéuticas. Molina y col (2008) realizaron un estudio sobre el transcriptoma de garbanzo en respuesta a la sequía, encontrando que la biosíntesis de proteínas disminuía al encontrarse la planta bajo este tipo de estrés; además encontraron que los procesos biológicos como la transducción de señales y la regulación de la transcripción estaban involucrados en respuesta temprana al estrés. Del mismo modo, Deokar y col (2011) realizaron un análisis comparativo entre las secuencias expresadas entre genotipos de garbanzo susceptibles y resistentes a la sequía, observando que este tipo de estrés estaba relacionado con la ruta de los flavonoides, ya sea en el proceso

metabólico o de biosíntesis, sugiriendo que la regulación del proceso de biosíntesis se ve afectado por la sequía.

Ashraf y col (2009) realizaron un estudio sobre el transcriptoma de garbanzo en respuesta a la marchitez utilizando un genotipo resistente y otro susceptible. Los autores identificaron un gran número de genes, de los cuales asignaron al 60 % de ellos una función específica, entre las que se encuentran regulación en los procesos de señalización y transcripción, proceso de traducción y metabolismo, siendo esta última la clase más grande con 14.56 % de los genes detectados, encontrándose genes implicados en varias rutas metabólicas como la de carbohidratos, ácidos grasos y proteínas. Además, encontraron que el 1.24 % de los genes estaban implicados en procesos de desarrollo, los cuales estaban asociados con la maduración y senescencia y, con proteínas de almacenamiento como las albúminas, las cuales se ha demostrado están involucradas en los procesos de respuesta a estrés. También pudieron identificar genes asociados a la biosíntesis de metabolitos secundarios, como chalcona sintasa y chalcona isomerasa.

El estudio del transcriptoma puede proporcionar ideas sobre la función de genes, los programas transcripcionales y las bases moleculares de diversos procesos celulares en leguminosas, incluso en ausencia de la secuencia del genoma. Garg y col (2011) realizaron el estudio de los transcriptomas de cinco tejidos de garbanzo (semillas, raíz, brotes, hojas y flores), el cual reveló que el mayor número de transcripciones tienen función en la membrana plasmática de los cloroplastos, que el 19.5 % de los genes intervienen en el proceso de metabolismo de proteínas y el 15.6 % están implicados en procesos de desarrollo, además de estar relacionados

con respuestas de diversos estímulos bióticos y abióticos, estrés y transducción de señales.

Agarwal y col (2012) realizaron un análisis comparativo del transcriptoma de garbanzo tipo kabuli con el de tipo desi, encontrando que el 71 % de los transcritos podría ser asignado a una función específica, de los cuales el 20.8 % estaba relacionado al metabolismo de proteínas, el 13.5 % representaba la respuesta a estímulos bióticos o abióticos, 13.3 % a respuesta a estrés y 12.2 % a procesos de desarrollo. Entre los transcritos también se encontraron aquellos asociados a cloroplastos, membrana plasmática y núcleo, siendo los más abundantes los de componentes celulares, pero en forma general, similares para ambos genotipos. Los resultados también mostraron que la longitud promedio de los transcritos y el tamaño del transcriptoma fueron mayores en los garbanzos tipo kabuli que en los desi, encontrando una amplia diversidad funcional (moleculares, procesos biológicos y componentes celulares) en los transcritos de kabuli; además, al observar el contenido de ADN de ambos genotipos, no encontraron diferencias significativas, a pesar de las claras diferencias fenotípicas entre ellos.

Jain y col (2013) realizaron un estudio sobre la secuencia del genoma de garbanzo, donde pudieron observar que de los genes encontrados solo 170 estaban asociados al metabolismo de carotenoides, mientras que 643 se asociaron al metabolismo de flavonoides.

El proceso de desarrollo de las semillas requiere de la expresión y regulación de varios genes de manera coordinada (Garg y Jain 2013). Pradhan y col (2014) desarrollaron un análisis global del transcriptoma de semillas de garbanzo en desarrollo, encontrando que la mayoría de los genes estaban involucrados en

funciones moleculares, seguido por procesos biológicos y de composición celular; también encontraron que el 93.3 % de los genes eran expresados en al menos una de las etapas en desarrollo, de los cuales el 65.8 % se expresaban en las primeras etapas de desarrollo, mientras que el 43.15 % eran expresados en las etapas posteriores. También, encontraron que los genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos eran mayormente expresados en las últimas etapas de desarrollo y en ellos se incluían genes de enzimas como la almidón sintasa y desramificadoras; en el mismo sentido, observaron que la expresión de genes de proteínas de almacenamiento aumentaba gradualmente al aumentar las etapas de desarrollo, mientras que los de enzimas y reguladores de la transcripción disminuían, lo cual podría favorecer el aumento de la calidad nutritiva de las semillas de garbanzo. Además, observaron la expresión de genes implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios importantes como flavonoides, entre ellos lo de las enzimas isoflavona sintasa, flavonol-3-hidroxilasa y chalcona isomerasa, presentaban una mayor expresión en la primera etapa de desarrollo, disminuyendo conforme aumentaba el desarrollo de la semilla, mientras que enzimas como la flavona sintasa y 2-hidroxi flavona sintasa, se expresaban mayormente en las últimas etapas de desarrollo. Esto sugiere que la biosíntesis de flavonoides puede estar asociada con la maduración de las semillas, por lo que el garbanzo puede servir como una buena fuente de antioxidantes.

IV JUSTIFICACIÓN

El garbanzo es un cultivo de gran importancia nutricional y nutracéutica debido a su contenido de almidón, proteínas y fitoquímicos. A pesar de ello, los recursos genéticos disponibles son aún limitados y los materiales de interés comercial existentes se han desarrollado tomando en cuenta características agronómicas. Es por ello que se requieren estudios para identificar marcadores moleculares asociados con características nutricionales y nutracéuticas, como contenido de proteína y almidón, lo cual daría un valor agregado a la producción de garbanzo. La identificación de genes o marcadores para su uso en el mejoramiento del garbanzo podría realizarse mediante el análisis transcripcional de genes candidatos en genotipos contrastantes en las características de interés. Por ello, en el presente trabajo se realizó un análisis de expresión de genes y su relación con características nutrimentales en genotipos de garbanzo de interés alimentario, esperando que este estudio sirva para la caracterización de los genes candidatos, y no sólo proporcione nuevos conocimientos sobre la comprensión del desarrollo de semillas, sino también proporcione recursos para la mejora del cultivo.

V HIPÓTESIS

Los genotipos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) seleccionados presentan una amplia variación en la expresión de genes implicados en la síntesis de almidón y proteínas, lo cual se relaciona con la variabilidad en el contenido de estos componentes.

VI OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión transcripcional de genes relacionados con la síntesis de almidón y proteínas en genotipos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) de interés alimentario.

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar las propiedades fisicoquímicas del gránulo de almidón en una selección de genotipos de garbanzo.
- 2) Determinar el perfil de las proteínas asociadas al gránulo de almidón y las principales fracciones de proteínas de almacenamiento en los genotipos de garbanzo seleccionados.
- 3) Analizar la expresión a nivel transcripcional de genes de síntesis de almidón y proteínas en los genotipos de garbanzo.
- 4) Determinar la relación entre los niveles de transcritos y las características evaluadas.

VII MATERIALES Y MÉTODOS

A MATERIALES

Se utilizaron dos genotipos de garbanzo tipo kabuli donados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), los cuales corresponden a genotipos comerciales (Blanco Sinaloa 92 y Jumbo 2010), así como dos genotipos de garbanzo tipo desi (ICC 6306 e ICC 3421) provenientes de la colección del Banco Mundial de Germoplasma del Instituto Internacional de Investigación de Cultivos para Zonas Tropicales Semiáridas (ICRISAT), de los cuales ICC 3421 ya está siendo utilizado en programas de mejoramiento de INIFAP (Figura 5). Estos materiales fueron cultivados en el Campo Experimental Valle de Culiacán (CEVACU) del INIFAP. Se cosecharon granos en desarrollo a los 20 y 30 días después de la antesis (20 y 30 DDA), y granos maduros. Los granos en desarrollo se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

B MÉTODOS

1 Obtención de harinas

Para la obtención de harinas, los granos fueron procesados con un molino mezclador de bolas modelo MM400 (Retsch, Haan, Alemania) y la harina se pasó por una malla #100 para obtener un tamaño de partícula homogéneo de 150 μm .

2 Propiedades fisicoquímicas del almidón

a Determinación de almidón total

El contenido de almidón total se determinó utilizando el kit comercial K-TSTA (Megazyme, Irlanda). Se pesaron 100 mg de harina de los genotipos en diferente

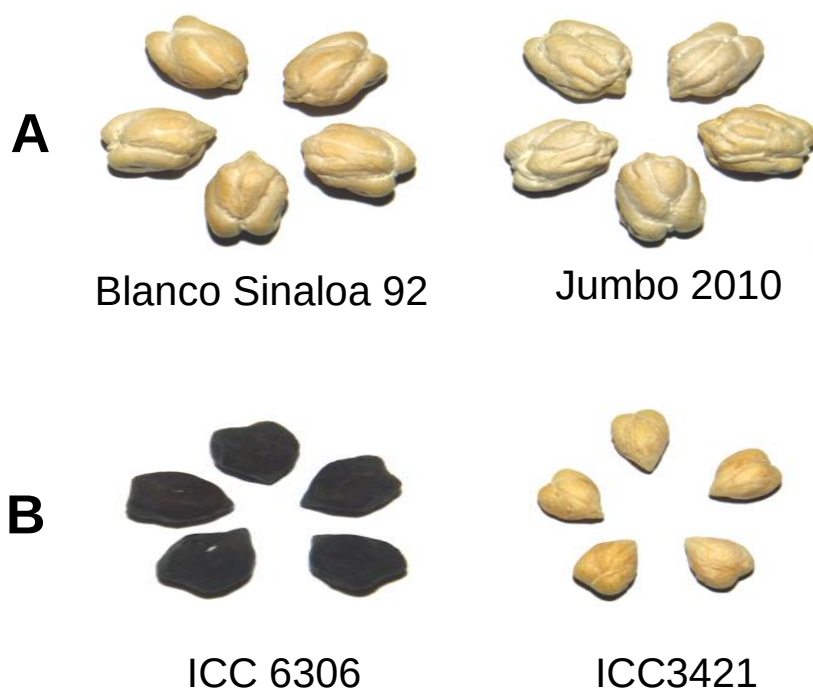


Figura 5. Genotipos de garbanzo utilizados como materiales. A) Tipo kabuli; B) Tipo desi.

estado de desarrollo (20 DDA, 30 DDA y maduro) a la cual se le agregó 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 2M 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 amiloglucosidasa. 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 1,800 g por 10 min (Eppendorf, Mod 5804 R, Hamburg, Alemania), 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 (Thermo Scientific, Mod BioMate 3S, USA). El porcentaje de almidón se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Almidón} = \Delta A \times F/P \times FV \times 0.9$$

Dónde:

ΔA = Absorbancia de la reacción

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

P = Peso de la muestra (mg)

FV = Volumen final del extracto (ml)

0.9 = Ajuste de masa molecular de D-glucosa anhidra en almidón (162/180)

b Aislamiento de gránulos de almidón

Los gránulos de almidón se aislaron de granos de garbanzo en desarrollo (20 y 30 DDA) y maduro 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, se pasaron a través de un filtro de 100 µm y centrifugaron a 13,000 g por 15 min (Eppendorf, Mod 5804 R, Hamburg, Alemania). El almidón obtenido se lavó cinco veces con amortiguador de extracción, etanol al 95 % y acetona fría, posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente durante 12 h.

c Determinación de amilosa y amilopectina

1) Pretratamiento del almidón

La determinación de amilosa se realizó con el kit K-AMYL 04/06 (Megazyme, Irlanda) en cada uno de los distintos estados de desarrollo del grano (20 DDA, 30 DDA y maduro). Se mezclaron 25 mg de almidón con 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), se agitó en un vórtex a baja velocidad y se calentó a ebullición en baño maría durante 1 min. El tubo se mezcló vigorosamente y se volvió a colocar en baño maría por 15 min con agitación intermitente cada 5 min. 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 un vórtex. Se añadieron otros 4 mL de etanol, se mezcló por inversión formando un precipitado y dejando reposar por al menos 15 min. Las muestras se

centrifugaron a 2,000 g por 5 min (Eppendorf, Mod 5804 R, Hamburg, Alemania) y el precipitado se escurrió por 10 min hasta asegurarse que todo el etanol se evaporara. Posteriormente, al precipitado se le añadieron 2 mL de DMSO, se colocaron en baño maría por 15 min con mezclado intermitente. Al retirar las muestras, inmediatamente se añadieron 4 mL del solvente de Concanavalina A (Con A), se mezcló vigorosamente y se vertió el contenido en matraces volumétricos (25 mL) con lavados constantes con el 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, se añadieron 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 y se centrifugó a 14,000 g por 10 min (Eppendorf, Mod 5417 C, Hamburg, Alemania) a temperatura ambiente. Se transfirió 1 mL del sobrenadante a un tubo de 15 mL y se añadieron 3 mL de buffer de acetato de sodio 100 mM pH 4.5, se mezcló y se calentó por 5 min en baño maría en ebullición. Posteriormente, el tubo se colocó en baño maría a 40 °C por 5 min. Se le agregaron 0.1 mL de las enzimas α -amilasa/amiloglucosidasa, se mezcló e incubó por 30 min a 40 °C y se centrifugó por 5 min a 2,000 g. A una alícuota de 1 mL del sobrenadante se le agregaron 4 mL del reactivo GOPOD (glucosa oxidasa/peroxidasa) y se incubó por 20 min a 40 °C, incluyendo un blanco y el estándar de Glucosa (D-Glucosa). Se midió la absorbancia de las muestras, el blanco y del estándar a 510 nm (Thermo Scientific, Mod BioMate 3S, USA).

3) Determinación de almidón total

Se mezclaron 0.5 mL de la solución A con 4 mL del buffer de acetato 100 mM, pH 4.5. Se agregaron 0.1 mL de la solución enzimática α -amilasa/amiloglucosidasa y se incubó la mezcla a 40 °C por 10 min. Se tomó una alícuota de 1 mL y se mezcló con 4 mL del reactivo GOPOD. Se incubó por 10 min a 40 °C, en el mismo momento que las muestras y el estándar.

La determinación de amilosa se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Amilosa} = \frac{\text{Abs (sobrenadante ConA)}}{\text{Abs (alícuota de almidón total)}} \times 66.8$$

Para la determinación del contenido de amilosa total, el cual hace referencia al contenido de este polímero dentro del grano, se tomaron los datos obtenidos de porcentaje de almidón y amilosa calculados con los métodos anteriormente descritos. La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\text{Amilosa total} = (\% \text{ Almidón} / 100) \times \% \text{ Amilosa}$$

d 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 (30 DDA y maduro) en una charola de aluminio y se le adicionaron 8.16 μ L de agua destilada, se dejó en reposo durante 15 minutos, posteriormente la charola se selló herméticamente dejándose reposar por 16 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, la charola se colocó en el calorímetro para la realizar

las determinaciones correspondientes. 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 durante 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:

$$\% \text{ Retrogradación} = (\Delta H_r / \Delta H_g) \times 100$$

3 Perfiles de proteínas asociadas al gránulo de almidón y de almacenamiento

a Cuantificación 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 harina de granos de garbanzo 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.

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 de proteínas asociadas al gránulo de almidón

Para la extracción de las proteínas asociadas al gránulo (PAG), 300 mg de almidón obtenido a partir de granos de garbanzo maduros, se lavó con agua fría y amortiguador de gelatinización [Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2 % (p/v), 2-mercaptoetanol 5 % (v/v)] y etanol 95 % (v/v) para remover proteínas superficiales; las muestras de almidón fueron incubadas con amortiguador de gelatinización por 15 min en un baño maría en ebullición para la liberación de las PAG. Inmediatamente la pasta formada fue congelada por 1 h a -20 °C, descongelada por 20 min a 40 °C en un baño maría y centrifugada a 13,000 g por 30 min a 4 °C (Eppendorf, Mod 5804 R, Hamburg, Alemania). Se recuperó el sobrenadante y mezcló con un volumen igual de ácido tricloroacético (TCA) al 30 % en acetona para la precipitación de las proteínas por al menos 2 h a -20 °C. Después se centrifugó durante 15 min a 4 °C y 13,000 g, la pastilla que se obtuvo de PAG se lavó cinco veces con acetona fría y se dejó secar durante toda la noche a temperatura ambiente. Las proteínas se resuspendieron en un amortiguador de tiourea [Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4 % (p/v), DTT 20 mM, Triton-X100 0.2 % (v/v)].

c Extracción de las fracciones de proteínas de almacenamiento

Para la extracción de proteínas de almacenamiento se empleó el método descrito por Dziuba y col (2014) con algunas modificaciones. Se utilizaron 0.5 g de harina de granos de garbanzo (20 DDA, 30 DDA y maduro), se le adicionaron 1 mL de hexano y se mezclaron durante 4 h a 20 °C (Thermomixer Compact Eppendorf AG). La mezcla se centrifugó a 17,000 g durante 15 min (Eppendorf, Mod 5417 C, Hamburg, Alemania). Se descartó el sobrenadante y a la pastilla se le adicionaron 1

mL de buffer de extracción I (H_2O desionizada estéril pH 8.0, CaCl_2 10 mM, MgCl_2 10 mM, PMSF 1 mM) y se mezclaron durante 4 h a 20 °C en un termomixer. Posteriormente se centrifugaron a 17,000 *g* durante 30 min. Se obtuvo el sobrenadante y la pastilla (residuo 1), el sobrenadante se puso a dializar contra agua por 3 días con tres cambios de agua al día. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 17,000 *g* durante 30 min. El sobrenadante formado se llevó a sequedad en un concentrador (Concentrador 5301 Eppendorf, Hambueger, Germany) para obtener la fracción de albúminas. Para continuar con la separación de proteínas se agregaron 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 se mezclaron durante 16 h a 20 °C en un termomixer. A continuación, se centrifugó a 17,000 *g* durante 30 min. En esta ocasión se obtuvo la pastilla (residuo 2) y el sobrenadante, el cual se puso a dializar y centrifugar de la misma manera que la fracción de albúminas. La pastilla obtenida después de la centrifugación correspondió a la fracción de globulinas.

d Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (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, USA) y una fuente de poder EC600-90 (Thermo EC, Waltham, MA, USA). Los marcadores de peso molecular (BioRad) fueron: miosina, 202.951 kDa; β -galactosidasa, 114.284 kDa; albúmina de suero bovino, 83.403 kDa; albúmina de huevo, 46.447 kDa; anhidrasa carbónica, 33.933 kDa; inhibidor de tripsina de soya, 227.167 kDa; lisozima, 17.532 kDa y aprotinina, 5.968 kDa. Los

extractos de cada una de las proteínas (equivalentes a 15 y 1 mg para albúminas y globulinas a 20 DDA; 10 y 0.75 mg harina para albúminas y globulinas a 30 DDA; 21, 5 y 0.5 mg de almidón o harina para PAG, albúminas y globulinas, respectivamente en estado maduro) 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 se colocaron en los pozos de los geles. Para las PAG se emplearon geles de 10 % (p/v) de concentración y para proteínas de almacenamiento geles de 12.5 % (p/v). La separación se llevó a cabo a un voltaje constante de 100 V. Las proteínas se visualizaron por tinción con una solución de azul brillante de Coomassie R-250 al 0.25 % (p/v) (Sigma, St Louis, MO, EUA) en 40 % de metanol y 10 % de ácido acético durante 60 min. Posteriormente, el gel se destiñó con una solución de metanol-ácido acético-agua (40:10:50 v/v). Se obtuvieron imágenes de los geles con un sistema de fotodocumentación XRS (BioRad, Hercules, CA, EUA). El contenido de cada una de las proteínas en las diferentes subfracciones se estimó densitométricamente por medio del programa Quantity One (BioRad, Hercules, CA, EUA), para lo cual se seleccionó la misma área/volumen en cada una de las subfracciones, tomando como referencia la de mayor intensidad y volumen. Estos análisis se realizaron por triplicado (tres geles).

e Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Las proteínas expresadas diferencialmente entre las muestras se identificaron por espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Primeramente, se lavaron los geles para eliminar el exceso de colorante azul de Coomassie y se removieron las

proteínas de interés utilizando un bisturí. El pedazo de gel removido se sometió a una serie de lavados con acetonitrilo (50 μ L) para eliminar el colorante y se secó al vacío durante 10 min. Las proteínas fueron reducidas por incubación con ditioneitol (DTT) 10 mM en NH_4HCO_3 0.1 M (1 h/56 °C) y posteriormente, alquiladas con iodoacetamida 55 mM en NH_4HCO_3 0.1 M por 45 min a temperatura ambiente. Los geles se lavaron con NH_4HCO_3 25 mM, se secaron con vacío e incubaron durante aproximadamente 12 h (37 °C) en NH_4HCO_3 25 mM conteniendo 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de tripsina grado secuenciación (Promega, Madison, WI, EUA). Los péptidos fueron concentrados y desalados utilizando puntas conteniendo resina tipo C18 en la punta (Zip-tip, Milipore, Billerica, MA, EUA). La mezcla de péptidos fue analizada con un sistema LC/MS acoplado con un espectro de masas con trampa de iones (LTQ-XL, Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) utilizando una fuente de iones nanospray (3.0 kV). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna capilar de fase reversa (New Objective) usando un gradiente de 5-80 % de acetonitrilo durante 120 min. La adquisición de los espectro de masas se realizó con el programa Xcalibur 2.2 (Thermo Scientific, San José, CA, EUA) en un rango de masa-carga (m/z) de 300–2000, y los iones más intensos fueron fragmentados por disociación inducida por colisión (CID, del inglés Collision Induced Dissociation). Los datos se analizaron con el programa Proteome Discoverer 1.3 usando el algoritmo SEQuest contra una base de datos referenciada. Los parámetros de búsqueda para modificaciones fueron los siguientes: Cisteína carbamidometilada como fija y oxidación de Metionina como variable. Las tolerancias fueron de 1.2 Da para el ión precursor y 0.6 para picos de fragmentación. El espectro MS/MS proporcionó información parcial de la secuencia

de los péptidos y éstos fueron comparados con secuencias de proteínas en las bases de datos.

4 Análisis de expresión de genes de síntesis de almidón y proteínas de almacenamiento por qRT-PCR

a Extracción de ARN total

La extracción de ARN se llevó a cabo de acuerdo a la metodología de Holding y col (2008) con modificaciones. Se inició tomando una muestra de 100 mg de cotiledón en desarrollo (20 y 30 DDA), al cual se le añadieron 200 μ L de amortiguador de extracción de ARN [Tris-HCl 50 mM (pH 8), LiCl 150 mM, EDTA 5 mM (pH 8), SDS 1 % (v/v)] y se homogeneizó inmediatamente con la ayuda de un pistilo, seguido de la adición de 200 μ L de fenol-cloroformo (1:1), donde el fenol fue previamente equilibrado con TRIS-HCl (pH 8). Tras una agitación, la muestra se colocó en hielo durante 5 min mezclando ocasionalmente. Enseguida la solución se transfirió a tubos de bloqueo de fase para una posterior centrifugación a 10,000 *g* por 10 min a 4 °C (Labnet Prism, Mod C2500-R, Edison, EUA). Se añadieron 200 μ L de fenol-cloroformo y se agitó, las muestras se centrifugaron a 10,000 *g* por 10 min a 4 °C. Se adicionaron 200 μ L de cloroformo, se agitó, se colocaron en hielo durante 5 min mezclando ocasionalmente y se centrifugó bajo las condiciones antes mencionadas. Una vez que se separaron las fases del tubo, la fase superior se transfirió a un nuevo tubo al cual se le agregó 1 mL de trizol, se agitó por 15 s y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se añadieron 200 μ L de cloroformo, se agitó, se incubó de 2 a 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 10,000 *g* por 10 min a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a

un tubo de microcentrifuga y se adicionaron 500 μ L de isopropanol, se agitó y se incubó durante 10 min en hielo. Enseguida se centrifugó a 10,000 g por 10 min a 4 °C. Una vez que las fases se separaron se pudo visualizar el precipitado de ARN. El sobrenadante se retiró del tubo y se agregaron 1 mL de etanol 70 % (v/v), se centrifugó a 10,000 g por 10 min a 4 °C. Nuevamente se retiró la fase acuosa para un posterior secado de la pastilla de ARN. Finalmente, se resuspendió en 50 μ L de agua tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC), inhibidor irreversible de ribonucleasas.

b Tratamiento del ARN con DNAsa

El ARN resuspendido se trató con DNAsa para eliminar el ADN genómico presente en la muestra. Se utilizó el kit DNase I (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA). A 1-2 μ g de ARN total se le agregó 1 μ L de amortiguador de reacción 10X, 1 μ L de DNAsa I (1 U/ μ L) y 6 μ L de agua DEPC. Después, la mezcla se incubó 15 min a temperatura ambiente, se añadió 1 μ L de la solución Stop y se incubó 15 min a 65 °C (Thermomixer Compact Eppendorf AG), finalmente se colocó en hielo para llevar a cabo la síntesis de ADNc.

c Síntesis de ADNc

La síntesis del ADNc se realizó utilizando el kit Go ScriptTM Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA). Se tomaron 8 μ L del ARN tratado con DNAsa I (1 U/ μ L) y se le agregó 1 μ L de primer oligo (dT)₁₅ (500 μ g/mL), la mezcla se incubó 5 min a 70 °C (Thermomixer Compact Eppendorf AG) e inmediatamente después, se colocó en hielo durante 5 min. Posteriormente, se centrifugó 10 s y se colocó en hielo.

En otro tubo se preparó la mezcla de reacción de transcripción reversa, la cual consiste de 4 μL de amortiguador de reacción 5X, 3 μL de MgCl_2 (25 mM), 1 μL de mezcla de nucleótidos (dNTPs) (10 mM), 2 μL de inhibidor de ribonucleasas (20 U/ μL) y 1 μL de la enzima transcriptasa reversa (RT) (200 U/ μL). Ambas mezclas fueron combinadas para tener un volumen final de 20 μL , el cual se incubó a temperatura ambiente durante 5 min (etapa de alineamiento), en seguida se llevó a cabo otra incubación a 42 °C por 50 min (etapa de extensión) y finalmente, se inactivó la enzima transcriptasa reversa por calentamiento a 70 °C por 15 min, la mezcla de ADNc se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

d Análisis de expresión de genes

Se comparó la expresión de genes relacionados con la síntesis de almidón y proteínas entre los genotipo de garbanzo estudiados. El ADNc fue cuantificado utilizando un espectro BioMate 3s (Thermo Scientific, Madison, EUA). A partir de 75 ng de ADNc se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; se utilizó el kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA) para el marcaje de los productos de la reacción y la amplificación se realizó en un sistema de tiempo real modelo StepOne (Applied Biosystems). Se utilizaron iniciadores los cuales fueron diseñados a partir de ADNc de secuencias provenientes de bases de datos y de la identificación de proteínas por espectrometría de masas para los principales genes de biosíntesis del almidón y proteínas, utilizando el programa Primer-BLAST disponible en la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (Cuadro 5). Estos fueron diseñados a una temperatura de alineación de 60 °C para amplificar una región de 70-270 pb. Las

Cuadro 5. Iniciadores utilizados para el análisis de expresión génica mediante PCR en tiempo real.

Nombre del gen	Nombre corto	Iniciador directo (5'-3')	Iniciador reverso (5'-3')
Enzima ramificadora de almidón	<i>SBE</i>	TCGTCCTCCGAAGCCAAAAG	ATGCTCCATCACAGCCATCA
Enzima desaramificadora de almidón tipo Isoamilasa	<i>ISA</i>	ATGACCAGGGGTAGCAGTCT	TTCCAGTTGCCAGCAAGTCA
Almidón sintasa unida al gránulo I	<i>GBSSI</i>	GCCAATCAAGGAGGAAGGGT	AGCTGCTAATGCTGTGGAA
Lipoxigenasa	<i>LOX</i>	CAGTTGTTGAACCCTTTGTTATAGCA	ACCTCCATCGTTGACCAAAGA
Vicilina	<i>VIC</i>	GTTTCTGTCGTTGGGTTCAATAC	CTCACACCCTCTTTCTTCCACAA
Legumina	<i>LEG</i>	CACAGCAGAGGTGGAAGCAA	TAGTGTCATTGGAAGGTTGGCA

condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C (15 s) y 60 °C (1 min) con una velocidad de rampa de 2.2 °C por segundo. Las curvas de fusión se obtuvieron por calentamiento de 65 °C a 95 °C con una velocidad de rampa de 0.5 °C por segundo.

Los niveles de expresión de los genes analizados se determinaron usando como control el gen factor de elongación 1A (*eEF1A*), el cual se ha observado tener poca variación en diferentes genotipos de garbanzo. Para cada gen analizado, el valor del ciclo umbral promedio (Ct) se calculó con tres réplicas para cada genotipo.

La expresión relativa fue calculada usando la ecuación:

$$2^{[WX-WC)-(GX-GC)]}$$

En dónde:

X= Gen de interés

C= Gen control *eEF1A*

W= Promedio del Ct en la línea de referencia

G= Promedio del Ct en otros genotipos

5 Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó utilizando un diseño unifactorial, cuyo factor correspondió a los diferentes genotipos evaluados y las variables de respuesta el contenido de almidón, amilosa, propiedades térmicas del almidón, contenido de proteína total, cuantificación de las fracciones de proteínas y la expresión génica.

El análisis de varianza se realizó mediante una comparación de medias por el método de Fisher con un nivel de significancia del 5 % empleando el programa Statgraphics Centurion 16.1 (StatPointTechnologies, Inc., Warrenton VA, EUA).

VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL GRÁNULO DE ALMIDÓN

1 Contenido y composición de almidón

a Contenido de almidón total

En el Cuadro 6 se muestra el contenido de almidón total en muestras de genotipos de garbanzo en diferentes estados de desarrollo (20 y 30 DDA) y maduro. El contenido de almidón a los 20 DDA se encontró en un rango de 25.87 a 31.84 g/100 g harina, siendo los genotipos ICC 6306 y Blanco Sinaloa 92 los que mostraron el menor y mayor valor, respectivamente.

A los 30 DDA, el contenido de almidón varió en un rango de 36.20 a 42.68 g/100 g harina (Cuadro 6), observándose el mayor contenido en el genotipo Jumbo 2010. El desarrollo de las semillas dicotiledóneas se puede dividir en tres etapas: etapa temprana (10 DDA), etapa intermedia (20 y 30 DDA) y etapa de maduración (40 DDA), siendo la etapa intermedia donde se da la expansión celular y la acumulación de nutrientes (Baud y col 2002; Pradhan y col 2014). De acuerdo con esta descripción, los resultados encontrados en este estudio muestran que a los 20 y 30 DDA se da la mayor acumulación de almidón, el principal compuesto de reserva del grano.

El contenido de almidón en grano maduro varió de 35.02 g/100 g harina en el genotipo desi ICC 3421 a 45.52 g/100 g harina en el genotipo kabuli Blanco Sinaloa 92 (Cuadro 6). Estos valores caen dentro del rango reportado por Quintero-Soto (2015) y Milán-Noris y col (2016) para algunos de estos genotipos cultivados en otro ciclo agrícola.

Cuadro 6. Contenido de almidón total en granos en desarrollo y maduro de genotipos de garbanzo.

Genotipo	20 DDA	30 DDA	Maduro
Blanco Sinaloa 92	31.84 ^a	41.85 ^a	45.52 ^a
Jumbo 2010	26.32 ^b	42.68 ^a	43.46 ^a
ICC 6306	25.87 ^b	39.58 ^b	43.02 ^a
ICC 3421	31.38 ^a	36.20 ^c	35.02 ^b

El contenido de almidón está expresado en g/100 g harina. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Fisher. Almidón total 20 DDA (LSD=2.47); Almidón total 30 DDA (LSD=1.30); Almidón total Maduro (LSD=4.63).

b Contenido de amilosa y amilopectina

Los porcentajes de amilosa y amilopectina en almidón de granos en desarrollo (20 y 30 DDA) y maduro de los genotipos de garbanzo se muestran en el Cuadro 7. A los 20 DDA, los genotipos mostraron un contenido de amilosa de 9.11 a 14.76 g/100 g almidón, siendo ICC 6306 el que presentó el mayor valor. A los 30 DDA, el contenido de este polímero se encontró en un rango de 20.67 a 26.05 g/100 g almidón, siendo Jumbo 2010 el genotipo que presentó el menor valor ($p < 0.05$).

En estado maduro los genotipos evaluados presentaron un porcentaje de amilosa de 21.23 a 28.86 g/100 g almidón para Jumbo 2010 e ICC 3421, respectivamente. Estos valores se encuentran dentro del rango reportado por Quintero-Soto (2015) en 15 genotipos de garbanzo en estado maduro (20.40 - 31.40 g/100 g almidón), dentro de los que se incluyen 9 genotipos desi y 6 kabuli. En el mismo sentido, los valores obtenidos para los genotipos tipo desi difieren ligeramente de los reportados por Milan-Noris y col (2016) para estos mismos materiales, lo cual se puede atribuir a factores ambientales debido a que fueron cultivados en ciclos agrícolas diferentes. Estudios previos han reportado que en promedio los genotipos desi presentan un mayor contenido de amilosa que los tipo kabuli (Singh y col 2004; Quintero-Soto 2015). Sin embargo, en el presente estudio se observó que el genotipo kabuli Blanco Sinaloa 92 no mostró diferencias significativas en el contenido de amilosa con respecto a los genotipos desi, lo cual también se presentó en granos en desarrollo.

El contenido de amilosa total a los 20 DDA se encontró en un rango de 2.90 a 3.81 g/100 g harina para Blanco Sinaloa 92 e ICC 6306, respectivamente (Cuadro 8);

Cuadro 7. Porcentaje de amilosa y amilopectina en almidón de granos en desarrollo y maduro de los genotipos de garbanzo.

Genotipo	20 DDA		30 DDA		Maduro	
	Amilosa	Amilopectina	Amilosa	Amilopectina	Amilosa	Amilopectina
Blanco	9.11 ^b	90.88 ^a	24.60 ^a	75.39 ^b	26.98 ^a	73.01 ^b
Sinaloa 92						
Jumbo 2010	13.82 ^a	86.17 ^b	20.67 ^b	79.32 ^a	21.23 ^b	78.76 ^a
ICC 6306	14.76 ^a	85.23 ^b	25.08 ^a	74.91 ^a	27.41 ^a	72.58 ^b
ICC 3421	10.22 ^b	89.77 ^a	26.05 ^a	73.94 ^a	28.86 ^a	71.13 ^b

Los contenidos de amilosa y amilopectina están expresados en g/100 g almidón. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Fisher. Amilosa 20 DDA (LSD=1.17); Amilopectina 20 DDA (LSD=1.17); Amilosa 30 DDA (LSD=1.81); Amilopectina 30 DDA (LSD=1.81); Amilosa maduro (LSD=2.92); Amilopectina maduro (LSD=2.92).

Cuadro 8. Contenido de amilosa y amilopectina total en genotipos de garbanzo en desarrollo y maduro.

Genotipo	20 DDA		30 DDA		Maduro	
	Amilosa	Amilopectina	Amilosa	Amilopectina	Amilosa	Amilopectina
Blanco	2.90 ^c	28.94 ^a	10.29 ^a	31.55 ^b	12.29 ^a	33.33 ^a
Sinaloa 92						
Jumbo 2010	3.63 ^{ab}	22.68 ^b	8.82 ^c	33.85 ^a	9.17 ^b	34.01 ^a
ICC 6306	3.81 ^a	22.05 ^b	9.93 ^{ab}	29.64 ^c	11.68 ^a	31.07 ^a
ICC 3421	3.21 ^{bc}	28.17 ^a	9.43 ^{bc}	26.77 ^d	10.10 ^b	24.92 ^b

Los contenidos de amilosa y amilopectina están expresados en g/100 g harina. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Fisher. Amilosa total 20 DDA (LSD=0.46); Amilopectina total 20 DDA (LSD=2.21); Amilosa total 30 DDA (LSD=0.82); Amilopectina total 30 DDA (LSD=1.12); Amilosa total maduro (LSD=1.23); Amilopectina total maduro (LSD=4.08).

mientras que, a los 30 DDA osciló de 8.82 g/100g harina para Jumbo 2010 a 10.29 g/100 g harina para Blanco Sinaloa 92, presentándose en ambos casos diferencias significativas entre los genotipos evaluados. En estado maduro, Jumbo 2010 fue el genotipo que mostró el menor contenido de amilosa total (9.17 g/100 g harina) mientras que Blanco Sinaloa 92 presentó el mayor valor (12.29 g/100 g harina).

2 Propiedades térmicas del almidón

Las propiedades térmicas de los procesos de gelatinización y retrogradación del almidón en granos de garbanzo en desarrollo (30 DDA) y maduro se muestran en el Cuadro 9. La temperatura pico de gelatinización (T_pG) a los 30 DDA se encontró en un rango de 64.96 a 67.42 °C, siendo significativamente mayor en los genotipos tipo kabuli. En estado maduro T_pG varió de 63.97 a 64.58 °C, no observándose diferencias significativas entre los genotipos evaluados. Estos valores se encuentran dentro del rango reportado por Hughes y col (2009), quienes encontraron valores de T_pG entre 63.29 y 65.51 °C al evaluar las propiedades térmicas del almidón de dos genotipos kabuli y dos desi en estado maduro. Este parámetro es importante para determinar las variables de cocimiento, ya que garbanzos con mayor T_pG se podrían utilizar para elaborar productos que requieran altas temperaturas durante su procesamiento.

La entalpía de gelatinización (ΔH_g) del almidón de granos en desarrollo (30 DDA) fue mayor en los genotipos kabuli, siendo significativamente mayor en el genotipo Jumbo 2010 (10.56 J/g) y menor en el genotipo desi ICC 3421 (8.11 J/g).

Cuadro 9. Propiedades térmicas de almidón de garbanzo en desarrollo y maduro.

Genotipo	30 DDA			Maduro		
	T _p G (°C)	ΔH _g (J/g)	%R	T _p G (°C)	ΔH _g (J/g)	%R
Blanco Sinaloa 92	67.10 ^a	9.12 ^b	55.31 ^a	63.97 ^a	5.91 ^c	60.81 ^a
Jumbo 2010	67.42 ^a	10.56 ^a	42.11 ^b	64.47 ^a	8.80 ^a	43.88 ^b
ICC 6306	64.96 ^b	8.77 ^b	55.70 ^a	64.32 ^a	7.21 ^b	54.86 ^a
ICC 3421	65.23 ^b	8.11 ^c	53.59 ^a	64.58 ^a	7.25 ^b	57.76 ^a

T_pG: Temperatura pico de gelatinización; ΔH_g: Entalpía de gelatinización; %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. T_pG 30 DDA (LSD=1.04); ΔH_g 30 DDA (LSD=0.62); %R 30 DDA (LSD=3.62); T_pG Maduro (LSD=1.12); ΔH_g maduro (LSD=1.08); %R maduro (LSD=6.62).

En estado maduro, Jumbo 2010 fue el genotipo que tuvo una mayor ΔH_g (8.80 J/g), mientras que Blanco Sinaloa 92 fue el que presentó el menor valor (5.91 J/g) (Cuadro 9). Se ha reportado que la ΔH_g del almidón de garbanzo en estado maduro presenta un amplio rango de 4.3 a 13.0 J/g (Chung y col 2008; Hughes y col 2009), lo cual depende fuertemente del genotipo. En este sentido, los resultados del presente estudio (5.91 - 8.80 J/g) caen dentro del rango de valores reportados en la literatura.

La entalpía de gelatinización se ha utilizado como medida general de la cristalinidad (calidad y cantidad de los cristales) y como indicador de la pérdida del orden molecular en el gránulo de almidón (Tester y Morrison 1990; Cooke y Gidley 1992). Matveev y col (2001) reportan que la entalpía de gelatinización se correlaciona negativamente con el contenido de amilosa, lo cual corresponde con lo observado en este estudio, ya que a los 30 DDA y en estado maduro, Jumbo 2010 fue el que presentó el menor porcentaje de amilosa y a su vez el mayor valor de ΔH_g .

El porcentaje de retrogradación (%R) del almidón después de siete días a 4 °C se muestra en el Cuadro 9. A los 30 DDA este parámetro varió de 42.11 a 55.70, siendo Jumbo 2010 el que presentó el valor significativamente menor. En estado maduro el rango de %R fue de 43.88 a 60.81, siendo también menor en el genotipo Jumbo 2010. 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 (Chung y Liu 2009; Yu y col 2009), por lo que es de esperarse que a mayor contenido de amilosa mayor retrogradación. Esto se vió reflejado en el presente estudio al observarse una correlación positiva entre ambas características tanto a los 30 DDA ($r= 0.873$, $p<0.001$) como en estado maduro ($r= 0.823$, $p<0.001$).

El porcentaje de retrogradación es un indicativo del almidón gelatinizado, el cual es capaz de recrystalizarse (reorganización de los polímeros) durante el almacenamiento. En este sentido, almidones con mayores valores de retrogradación son menos aptos para productos que requieran ser almacenados en refrigeración.

B CONTENIDO Y PERFIL DE PROTEÍNAS ASOCIADAS AL GRÁNULO DE ALMIDÓN Y PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO

1 Contenido de proteína total

El garbanzo ha sido reconocido como fuente importante de proteína de gran potencial para la dieta humana, principalmente para países en desarrollo, por lo que está clasificado dentro de los granos de alto valor proteínico. El Cuadro 10 muestra el contenido de proteína total de los cuatro genotipos evaluados. El rango de proteína total encontrado en los genotipos analizados fue de 20.98 a 29.52 g/100 g de harina, destacando el genotipo ICC3421 que fue el que presentó el mayor contenido.

Diversos investigadores han reportado una variación de proteína total en garbanzo de 13.47 a 25.70 g/100g harina (Dhawan y col 1991; Mickowska y col 2013), encontrando que el límite superior observado en nuestro estudio es mayor al reportado por estos autores, lo cual puede atribuirse a diferencias en la base genética de los materiales estudiados y las condiciones de cultivo.

Cabe mencionar que el genotipo ICC 3421 está siendo utilizado en el programa de mejoramiento del INIFAP. De manera general, se observó una mayor cantidad de proteína total en los genotipos desi, los cuales a su vez presentaron el menor contenido de almidón.

Cuadro 10. Contenido de proteína total en genotipos de garbanzo maduro.

Genotipo	Proteína Total (g/100g harina bs)
Blanco Sinaloa 92	20.98 ^c
Jumbo 2010	23.99 ^b
ICC 6306	24.81 ^b
ICC 3421	29.52 ^a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Fisher. Proteína total (LSD=1.04).

2 Acumulación de proteínas asociadas al gránulo de almidón

La Figura 6 muestra la separación de proteínas asociadas al gránulo de almidón en grano maduro de los genotipos de garbanzo estudiados. Los perfiles obtenidos son similares a los observados previamente para proteínas asociadas al gránulo en maíz (Grimaud y col 2008; Salazar-Salas y col 2014). Dos de las cuatro bandas observadas en el gel fueron identificadas por espectrometría de masas (Cuadro 11), mientras que para la identidad de las otras dos proteínas se tomó como base el peso molecular de proteínas del mismo tipo observadas en maíz (Agama-Acevedo y col 2013; Soto-López 2015).

La banda más abundante observada en la Figura 6 corresponde a la enzima almidón sintasa unida al gránulo (GBSSI); las otras bandas que fueron identificadas corresponden a las enzimas almidón sintasa soluble (SSS), enzima ramificadora de almidón (SBE) y piruvato fosfato dicinasa (PPDK), las cuales están involucradas en la biosíntesis de amilopectina y en el metabolismo de carbohidratos.

Se realizó un análisis densitométrico solamente para las proteínas GBSSI y SBE, ya que la poca intensidad de las bandas de las otras dos proteínas (SSS y PPDK) no permitió su análisis. La mayor acumulación de GBSSI se observó en el genotipo ICC 3421, aunque solamente se observaron diferencias significativas en el genotipo Jumbo 2010, que presentó el menor valor (Cuadro 12). GBSSI es exclusivamente responsable de la síntesis de amilosa (Preiss 1988; Smith y Martin 1993), por lo que al realizar una correlación entre la acumulación de esta enzima y el porcentaje de amilosa en estado maduro se observó una correlación positiva ($r=0.66$, $p<0.05$). Esto se vio reflejado de mejor manera en el genotipo ICC 3421, el cual

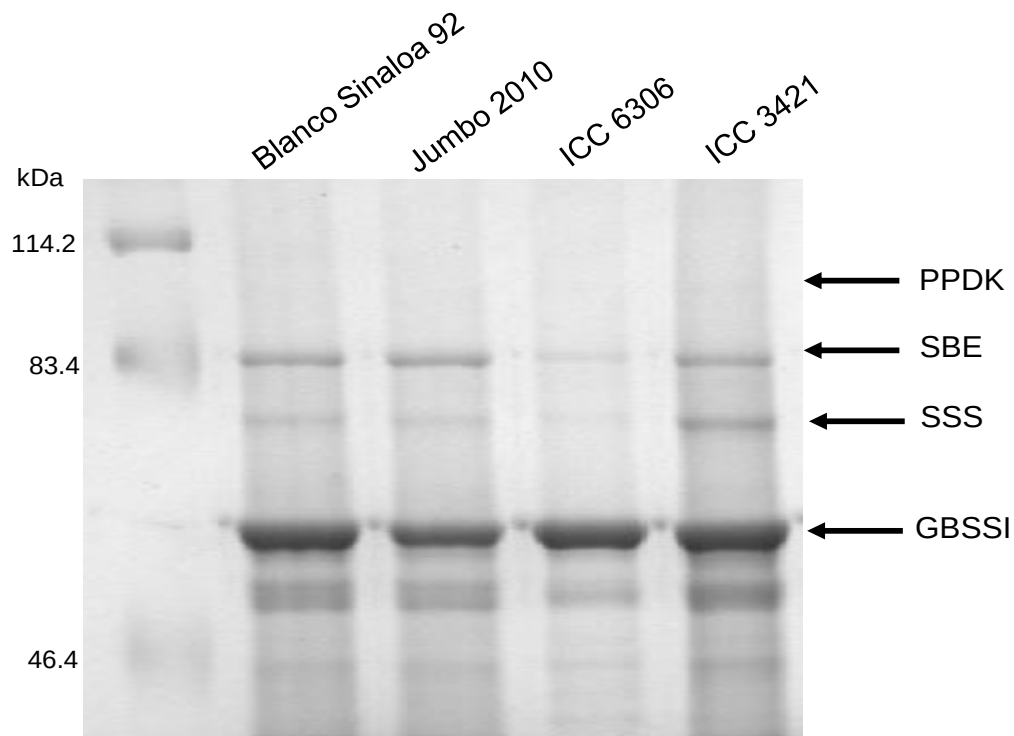


Figura 6. Perfil de proteínas asociadas al gránulo de almidón (PAG) de granos de garbanzo en estado maduro. A la izquierda se muestran los tamaños de los marcadores de peso molecular y a la derecha la identidad de las proteínas asociadas al gránulo. PPDK: Piruvato fosfato dicinasa, SBE: Enzima ramificadora de almidón, SSS: Almidón sintasa soluble, GBSSI: Almidón sintasa unida al gránulo I.

Cuadro 11. Identificación por espectrometría de masas en tándem de proteínas asociadas al gránulo de almidón en genotipos de garbanzo.

ID Base de datos	Proteína	PM Teórico	PM Observado	% Cobertura	Número de péptidos concordantes
Q43092	Almidón sintasa unida al gránulo I (GBSSI)	66.3	61.34	34	26
P09918	Almidón Sintasa Soluble (SSS)	67.6	76.73	29.69	17

Cuadro 12. Análisis densitométrico de las fracciones de proteínas asociadas al gránulo de almidón en los genotipos de garbanzo evaluados.

Genotipo	PAG	
	GBSSI	SBE
Blanco Sinaloa 92	372373 ^a	202898 ^a
Jumbo 2010	293635 ^b	222811 ^a
ICC 6306	376620 ^a	74609 ^b
ICC 3421	380239 ^a	104109 ^b

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Fisher. GBSSI (LSD=62610); SBE (LSD=84798).

presentó la mayor acumulación de esta proteína y a su vez el mayor porcentaje de amilosa.

En el caso de SBE, los genotipos ICC 6306 y Jumbo 2010 fueron los que mostraron la menor y mayor acumulación, respectivamente (Cuadro 12), encontrándose diferencias significativas en la acumulación de esta proteína entre los dos tipos de garbanzo. Esta enzima es la encargada de transferir cadenas de glucosa al C₆ de un residuo de glucosa de otra cadena formando la molécula de amilopectina, por lo que una mayor acumulación de esta proteína se vería reflejado en un mayor contenido de polisacárido, lo cual se pudo observar en el genotipo Jumbo 2010 que fue el que tuvo un mayor porcentaje de amilopectina en estado maduro y una mayor acumulación de SBE, coincidiendo con lo establecido en estudios previos.

3 Acumulación de proteínas de almacenamiento

a Albúminas

En la Figura 4 se muestra la separación electroforética (SDS-PAGE) de la fracción de albúminas extraídas de la misma cantidad de harina en los 4 genotipos de garbanzo evaluados. Perfiles similares han sido reportados previamente por diversos investigadores en garbanzo (Clemente y col 2000; Chang y col 2012; Quintero Soto 2015).

Se pudieron identificar dos bandas correspondientes a la proteína lipoxigenasa (101.58 kDa) y albúmina 2S (26.40 kDa), cuya identidad fue confirmada por espectrometría de masas (Cuadro 13).

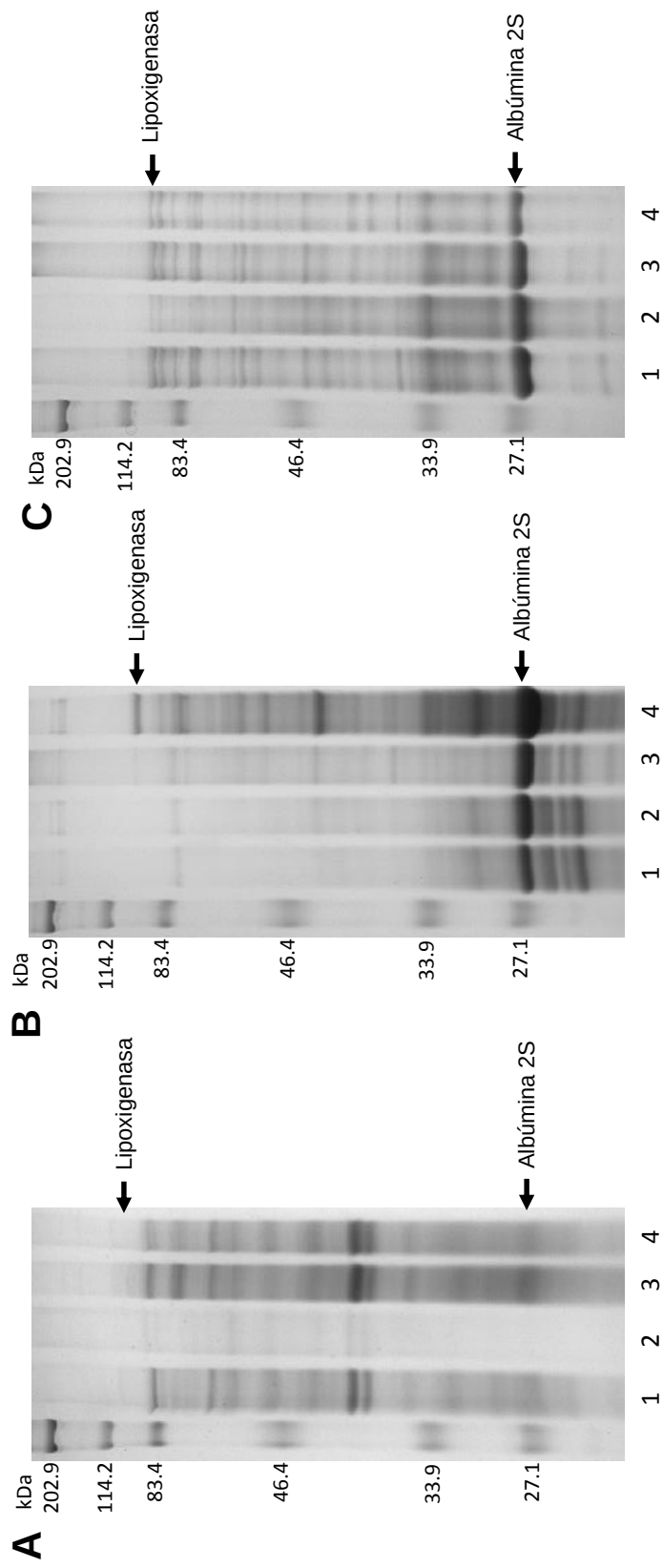


Figura 7. Separación por SDS-PAGE de la fracción de albúminas de granos en desarrollo y maduro de genotipos de garbanzo. (A) 20 DDA; (B) 30 DDA. (C) Grano maduro. A la izquierda se muestran los tamaños de los marcadores de peso molecular; a la derecha las identidades de las proteínas. Carriles: 1, Blanco Sinaloa 92; 2, Jumbo 2010; 3, ICC 6306; 4, ICC 3421.

Cuadro 13. Identificación por espectrometría de masas en tándem de proteínas de almacenamiento correspondientes a la fracción de albúminas en genotipos de garbanzo.

ID Base de datos	Proteína	PM Teórico	PM Observado	% Cobertura	Número de péptidos concordantes
Q9M3Z5	Lipoxigenasa (fragmento)	61	101.58	28.2	17
G1K3R9	Albúmina 2S	25.7	26.40	62.56	22

La lipoxigenasa es una enzima involucrada en la degradación de ácidos grasos poliinsaturados, utilizando 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). A los 20 DDA, solo se pudo identificar dicha enzima en los genotipos tipo desi y en cantidades muy pequeñas, observándose una mayor intensidad en el ICC 6306 (Figura 7A); pero debido a la poca acumulación de la proteína, no se pudo cuantificar densitométricamente. Este mismo comportamiento se observó a los 30 DDA; sin embargo, en este estado de desarrollo se encontró una mayor acumulación de la enzima en el genotipo ICC 3421 (Cuadro 14). Esto pudiera relacionarse con el hecho de que los genotipos desi, generalmente presentan una mayor resistencia a estrés biótico. En estado maduro pudo observarse la acumulación de lipoxigenasa en los genotipos kabuli, no encontrándose diferencias significativas ($p>0.05$) en la acumulación de esta enzima entre los genotipos evaluados (Figura 7C, Cuadro 14).

La albúmina 2S de 22.6 kDa se ha descrito en chícharo como la albúmina PA2 y PA1 o albúmina 2S (Casey y col 1993). PA2 es un homodímero que ha sido purificado y caracterizado en chícharo, descrito como una lectina capaz de aglutinar eritrocitos humanos, presente en chícharos y garbanzos (Vioque y col 1998). Debido a la poca intensidad y uniformidad observada de las bandas en el gel a los 20 DDA, esta proteína no pudo ser cuantificada densitométricamente (Figura 7A). A los 30 DDA, se observó una mayor acumulación en los genotipos desi, siendo ICC 3421 el que presentó la mayor acumulación (Figura 7B, Cuadro 14). Se ha reportado que la

Cuadro 14. Cuantificación densitométrica de la fracción de albúminas.

Genotipo	Albúminas			
	30DDA		Maduro	
	Lipoxigenasa	Albúmina 2S	Lipoxigenasa	Albúmina 2S
Blanco	ND	520651 ^b	240189 ^a	477935 ^a
Sinaloa 92	ND	537491 ^b	236436 ^a	415004 ^b
Jumbo 2010	ND	537491 ^b	236436 ^a	415004 ^b
ICC 6306	148225 ^b	563605 ^{ab}	221823 ^a	370208 ^b
ICC 3421	232842 ^a	593384 ^a	245229 ^a	274378 ^c

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Fisher. ND: No detectada.

Lipoxigenasa 30 DDA (LSD=18747), Albúmina 2S 30 DDA (LSD=45064), Lipoxigenasa maduro (LSD=86994), Albúmina 2S maduro (LSD=46979).

síntesis de PA2 se limita en gran parte a la segunda mitad del desarrollo de la semilla con un nivel máximo de síntesis alrededor de los 25 DDA (Chandler y col 1984), lo cual coincide con lo encontrado en este estudio, ya que hasta los 30 DDA pudieron observarse bandas bien definidas correspondientes a esta proteína.

En estado maduro, se observó lo opuesto en la acumulación de esta proteína en comparación a los 30 DDA, ya que de manera general los genotipos kabuli mostraron una mayor acumulación (Cuadro 14). Una mayor precocidad observada en los genotipos desi respecto a los kabuli, explica cómo estos genotipos mantienen una mayor acumulación de proteínas durante el desarrollo debido a una síntesis temprana, mientras que a etapas tardías, es decir, cercanas a la maduración, los genotipos kabuli empiezan la síntesis de proteínas a una mayor velocidad resultando en una acumulación mayor en el grano maduro.

b Globulinas

La separación por SDS-PAGE de la fracción de globulinas extraídas de la misma cantidad de harina en los cuatro genotipos de garbanzo evaluados mostró un perfil similar al reportado previamente en otros genotipos de garbanzo (Guéguen 1991; Sanchez-Vioque y col 1999; Quintero-Soto, 2015). Se pudieron identificar seis bandas, las cuales corresponden a Vicilina 7S y legumina 11S subunidad α y β (Figura 8), las cuales fueron corroboradas al identificarlas por espectrometría de masas (Cuadro 15).

La proteína identificada como vicilina 7S de 76.16 kDa es similar a la reportada por Chang y col (2012), quienes identificaron una vicilina 7S de 70.2 kDa.

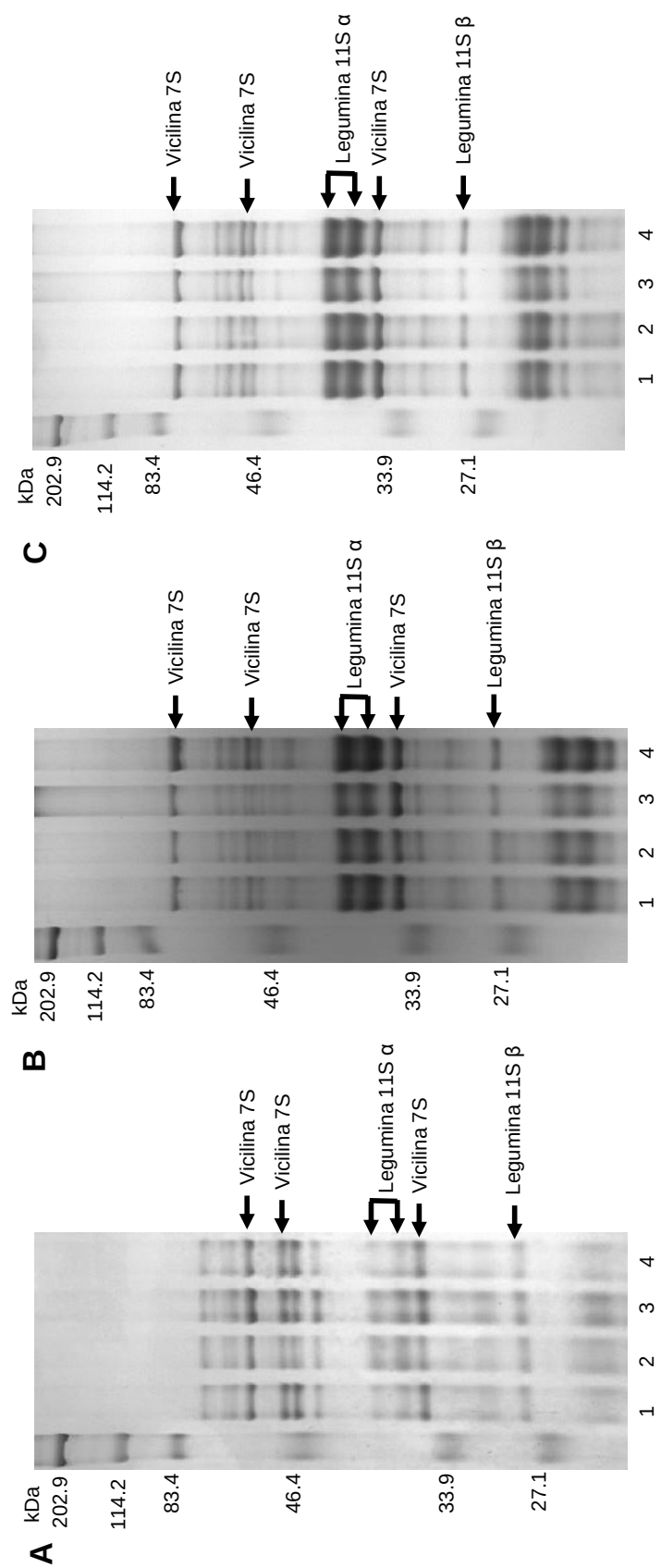


Figura 8. Separación por SDS-PAGE de la fracción de globulinas de granos en desarrollo y maduro de genotipos de garbanzo. (A) 20 DDA; (B) 30 DDA; (C) Grano maduro. A la izquierda se muestran los tamaños de los marcadores de peso molecular; a la derecha las identidades de las proteínas. Carriles: 1, Blanco Sinaloa 92; 2, Jumbo 2010; 3, ICC 6306; 4, ICC 3421.

Cuadro 15. Identificación por espectrometría de masas en tándem de proteínas de la fracción de globulinas en genotipos de garbanzo.

ID Base de datos	Proteína	PM Teórico	PM Observado	% Cobertura	Número de péptidos concordantes
P02854	Vicilina	46.4	51.74	35.85	17
Q9SMJ4	Legumina	56.2	40.7	28.83	16

Las bandas de 51.74 y 35.81 kDa, fueron similares a las reportados para las proteínas 7S de chícharo de 50 y 35 kDa, respectivamente (Guéguen 1991). De manera general, se observó que a los 20 DDA los genotipos desi tuvieron una mayor acumulación de esta proteína (Figura 8A, Cuadro 16). Este mismo comportamiento se observó a los 30 DDA (Figura 8B), mientras que en estado maduro no se encontraron diferencias significativas en la acumulación de esta proteína entre los genotipos evaluados (Cuadro 16).

Se identificaron dos bandas que corresponden a la proteína legumina 11S subunidad α , una de 39.49 kDa, la cual corresponde a la reportada por Sánchez-Vioque y col (1999) en garbanzo (39 kDa), mientras que la otra banda presentó un peso molecular de 37.96 kDa, la cual es comparable con una banda identificada por Chang y col (2011).

La banda identificada como legumina 11S subunidad β (26.98 kDa) fue reportada previamente por Sánchez-Vioque y col (1999) y Zaccardelli y col (2013) y es comparable con la subunidad 11S de soya reportada por diferentes autores (Moreira y col 1979; Sathe y col 1987). A los 20 DDA, el genotipo Blanco Sinaloa 92 fue el que presentó una mayor acumulación de esta proteína, mientras que a los 30 DDA su mayor acumulación se observó en el genotipo ICC 3421. No se encontraron diferencias significativas en la acumulación de esta proteína en estado maduro (Cuadro 16).

El análisis densitométrico mostró que de manera general el genotipo ICC 3421 fue el que presentó una mayor acumulación de las fracciones de proteína analizadas, lo que coincide con el hecho de que este material fue el que presentó el mayor

Cuadro 16. Cuantificación densitométrica de la fracción de globulinas.

Estado de desarrollo	Proteína	Blanco Sinaloa 92	Jumbo 2010	ICC 6306	ICC 3421
20 DDA	Vicilina 76.16 kDa	159729 ^a	148791 ^a	162613 ^a	162708 ^a
	Vicilina 51.74 kDa	279469 ^b	183165 ^c	282900 ^{ab}	302460 ^a
	Legumina α 39.49 kDa	120561 ^b	187862 ^a	199644 ^a	135628 ^b
	Legumina α 37.96 kDa	164439 ^b	232380 ^a	240437 ^a	170438 ^b
	Vicilina 35.81 kDa	226514 ^{bc}	177508 ^c	294027 ^a	243189 ^{ab}
	Legumina β 26.98 kDa	198872 ^a	142381 ^{bc}	171504 ^{ab}	117868 ^c
30 DDA	Vicilina 76.16 kDa	239739 ^b	211538 ^c	258161 ^b	362929 ^a
	Vicilina 51.74 kDa	273650 ^b	254948 ^{bc}	239985 ^c	377998 ^a
	Legumina α 39.49 kDa	402699 ^b	353623 ^c	365478 ^c	478747 ^a
	Legumina α 37.96 kDa	463717 ^b	402911 ^c	396441 ^c	520282 ^a
	Vicilina 35.81 kDa	461587 ^b	414040 ^c	463782 ^b	497450 ^a
	Legumina β 26.98 kDa	299099 ^b	264086 ^c	247787 ^c	369604 ^a
Maduro	Vicilina 76.16 kDa	197182 ^{ab}	153938 ^b	193684 ^{ab}	252890 ^a
	Vicilina 51.74 kDa	163870 ^a	141914 ^a	178600 ^a	225008 ^a
	Legumina α 39.49 kDa	400744 ^a	423796 ^a	458037 ^a	472274 ^a
	Legumina α 37.96 kDa	467051 ^{ab}	425270 ^b	483622 ^a	481621 ^a
	Vicilina 35.81 kDa	496332 ^b	546789 ^a	522686 ^{ab}	568400 ^a
	Legumina β 26.98 kDa	151496 ^a	163365 ^a	177410 ^a	147102 ^a

Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Fisher. Vicilina 76.16 kDa 20 DDA (LSD=31684); Vicilina 51.74 kDa 20 DDA (LSD=22183); Legumina 39.49 kDa 20 DDA (LSD=41288); Legumina 37.96 kDa (LSD=36429); Vicilina 35.81 kDa 20 DDA (LSD=56918); Legumina β 20 DDA (LSD=30694); Vicilina 76.16 kDa 30 DDA (LSD=19357); Vicilina 51.74 kDa 30 DDA (LSD=24610); Legumina 39.49 kDa 30 DDA (LSD=16099); Legumina 37.95 kDa 30 DDA (LSD=32923); Vicilina 35.81 kDa 30 DDA (LSD=22841); Legumina β 30 DDA (LSD=32698); Vicilina 76.16 kDa maduro (LSD=84371); Vicilina 51.74 kDa maduro (LSD=98129); Legumina 39.49 kDa maduro (LSD=90464); Legumina 37.96 kDa maduro (LSD=50041); Vicilina 35.81 kDa maduro (LSD=46938); Legumina β maduro (LSD=64025).

contenido de proteína total, por lo que está siendo utilizado en programas para la mejora de esta característica.

C CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES DE SÍNTESIS DE ALMIDÓN Y PROTEÍNAS EN GRANOS EN DESARROLLO DE LOS GENOTIPOS DE GARBANZO

La variabilidad en las características evaluadas es debida a cambios en la expresión de genes de síntesis de almidón y proteínas de almacenamiento, por lo que se determinaron los cambios transcripcionales en seis genes involucrados en dichos procesos (isoamilasa, enzima ramificadora, almidón sintasa unida al gránulo de almidón, lipoxigenasa, vicilina y legumina) en granos de garbanzo en distintas etapas de desarrollo (20 y 30 DDA). Este análisis se realizó mediante PCR en tiempo real y se determinaron niveles relativos de expresión con respecto al genotipo Blanco Sinaloa 92, utilizando el gen *eEF1A* como control interno, debido a que se ha identificado como uno de los genes más adecuados para la normalización de los datos de PCR en tiempo real en garbanzo (Garg y col 2010).

1 Genes de enzimas de síntesis de almidón

a Isoamilasa

La enzima desramificadora de almidón isoamilasa (ISA) hidroliza los enlaces glucosídicos α -1,6 de amilopectina y fitoglucógeno (Van der Maarel y col 2002). Los niveles de expresión del gen que codifica para esta enzima a los 20 DDA (Figura 9) fueron mayores en los genotipos desi. Este gen mostró niveles de transcritos 2.16 veces mayores en el genotipo ICC 3421 respecto al de referencia Blanco Sinaloa 92.

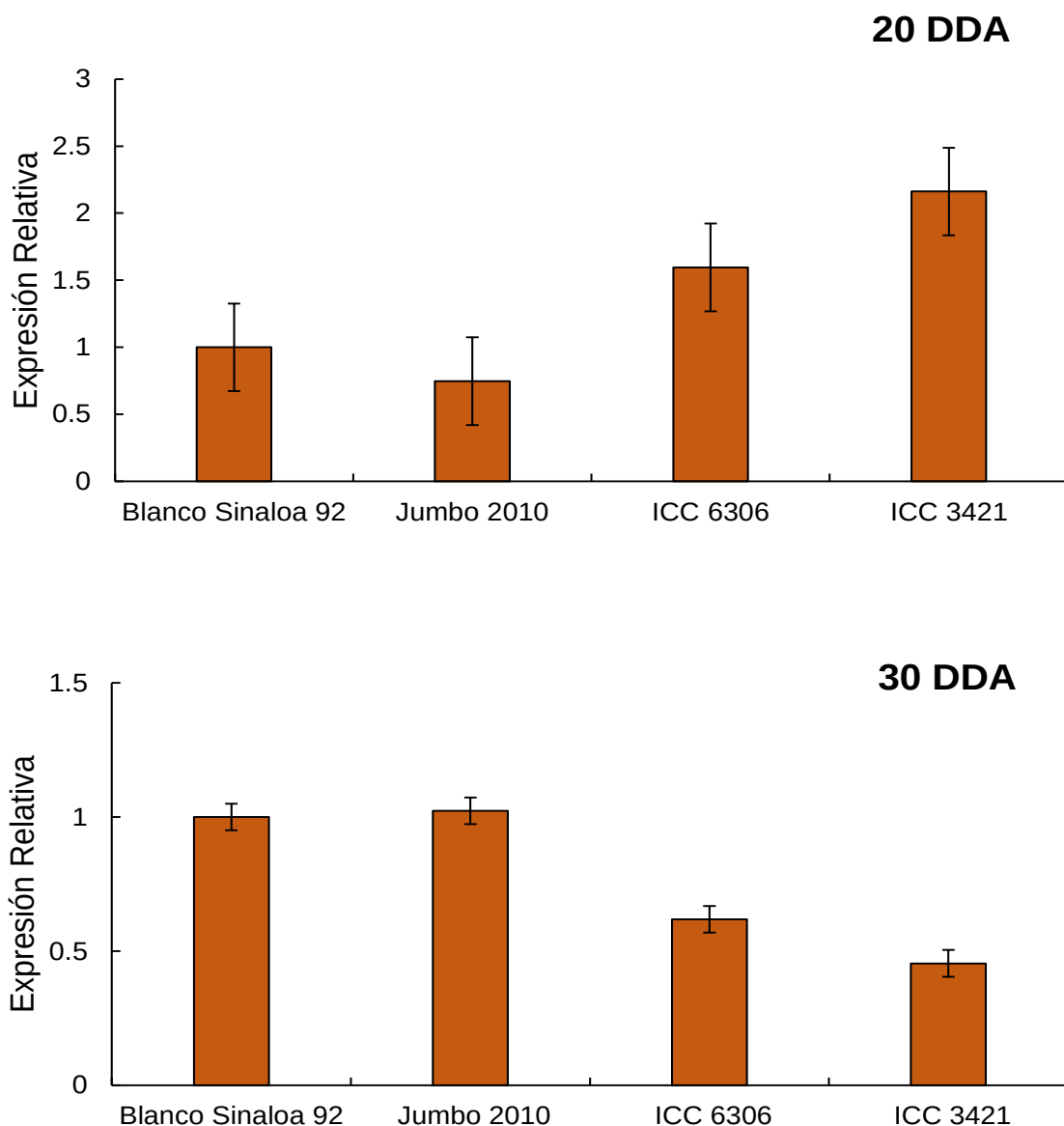


Figura 9. Expresión relativa del gen que codifica para la enzima isoamilasa en granos de garbanzo en desarrollo. La expresión de los genes se calculó utilizando al gen *eEF1A* como control y tomando como referencia el genotipo Blanco Sinaloa 92, cuyo nivel de expresión tomó el valor de 1. Las barras indican diferencias mínimas significativas ($P < 0.05$) basadas en la prueba de Fisher; 20 DDA (LSD=0.65), 30 DDA (LSD=0.09).

La mayor expresión de este gen podría estar favoreciendo una mayor acumulación de la enzima desramificadora de almidón, resultando en un mayor contenido de amilopectina con una menor proporción de ramificaciones, sin embargo al evaluar el contenido de amilopectina total a los 20 DDA, no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos Blanco Sinaloa 92 e ICC 3421, por lo que estas diferencias a nivel transcripcional no necesariamente se ven reflejadas en cambios significativos en la acumulación o actividad de la enzima. Además, se requieren estudios adicionales para establecer si existen variaciones en el grado de ramificación de la amilopectina en estos materiales.

Cuando los niveles de expresión del gen que codifica para la enzima ISA se evaluaron a los 30 DDA (Figura 9), se pudo observar que los genotipos kabuli tuvieron una expresión significativamente mayor que los tipo desi, lo cual es opuesto a lo encontrado a los 20 DDA (Figura 9), sugiriendo una mayor precocidad de los genotipos desi respecto a los kabuli. Los niveles de expresión coinciden con los resultados obtenidos de amilopectina total en esta etapa de desarrollo, ya que los genotipos kabuli tuvieron una mayor acumulación de este polisacárido (Cuadro 8).

b Enzima ramificadora de almidón

La enzima ramificadora de almidón (SBE), cataliza la formación del enlace glucosídico α -1,6 durante la síntesis de amilopectina. A los 20 DDA, el análisis de PCR en tiempo real reveló una expresión significativamente mayor (2.11 veces) de este gen en el genotipo ICC 6306 con respecto a Blanco Sinaloa 92 (Figura 10), expresándose mayormente en los genotipos desi. Los mayores niveles de transcritos

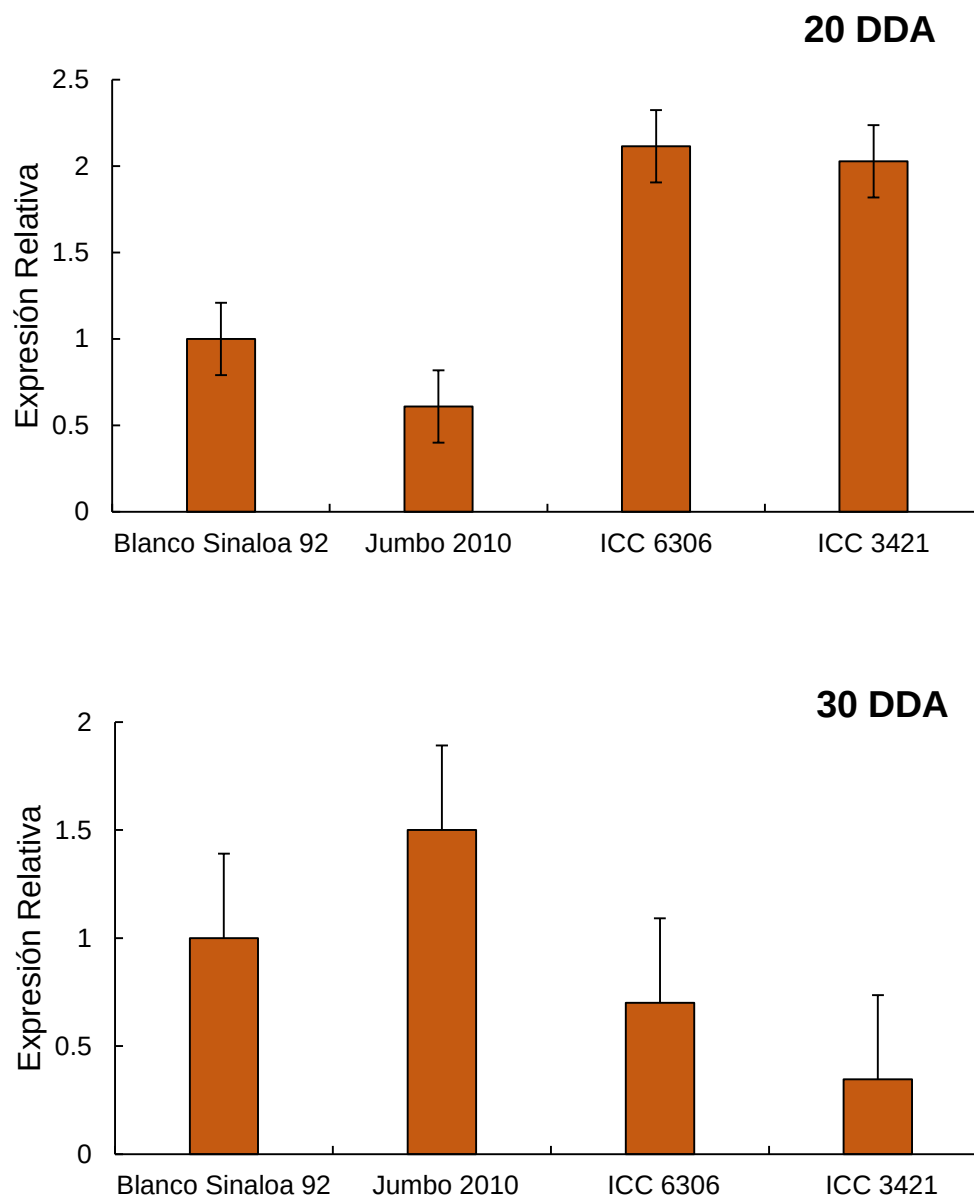


Figura 10. Expresión relativa del gen que codifica para la enzima ramificadora de almidón en granos de garbanzo en desarrollo. La expresión de los genes se calculó utilizando al gen *eEF1A* como control y tomando como referencia el genotipo Blanco Sinaloa 92, cuyo nivel de expresión tomó el valor de 1. La barras indican diferencias mínimas significativas ($P < 0.05$) basadas en la prueba de Fisher; 20 DDA (LSD=0.41), 30 DDA (LSD=0.78).

podrían estar favoreciendo una mayor acumulación de esta enzima, favoreciendo una mayor acumulación de amilopectina en el grano. Sin embargo, el contenido de amilopectina total en este estado de desarrollo no coincide con los niveles de expresión.

Por otro lado, a los 30 DDA se observó una mayor expresión de este gen en el genotipo Jumbo 2010, siendo significativamente mayor que los genotipos desi (Figura 10). Esta mayor expresión podría favorecer una mayor acumulación de amilopectina, lo cual coincide con lo encontrado en este estudio, ya que a los 30 DDA el contenido de amilopectina total en Jumbo 2010 fue significativamente mayor que los desi (Cuadro 8). Además, los mayores niveles de transcritos podría estar favoreciendo la acumulación de la enzima para la cual codifica este gen. En estado maduro, los genotipos kabuli tuvieron una acumulación significativamente mayor de la enzima SBE que los genotipos desi (Cuadro 12), coincidiendo con los niveles de expresión a los 30 DDA. Este estado de desarrollo es el más cercano al maduro, por lo que los niveles de transcritos encontrados reflejan de mejor manera lo esperado en la acumulación de esta enzima, una vez que la semilla ha madurado.

c Almidón sintasa unida al gránulo

El análisis de expresión del gen que codifica para la enzima almidón sintasa unida al gránulo I (GBSSI), la cual es responsable de la síntesis de amilosa en el grano, reveló que a los 20 DDA el nivel de transcritos de este gen fue 1.97 veces mayor en ICC 6306 que en Blanco Sinaloa 92 (Figura 11). La mayor expresión del gen coincide

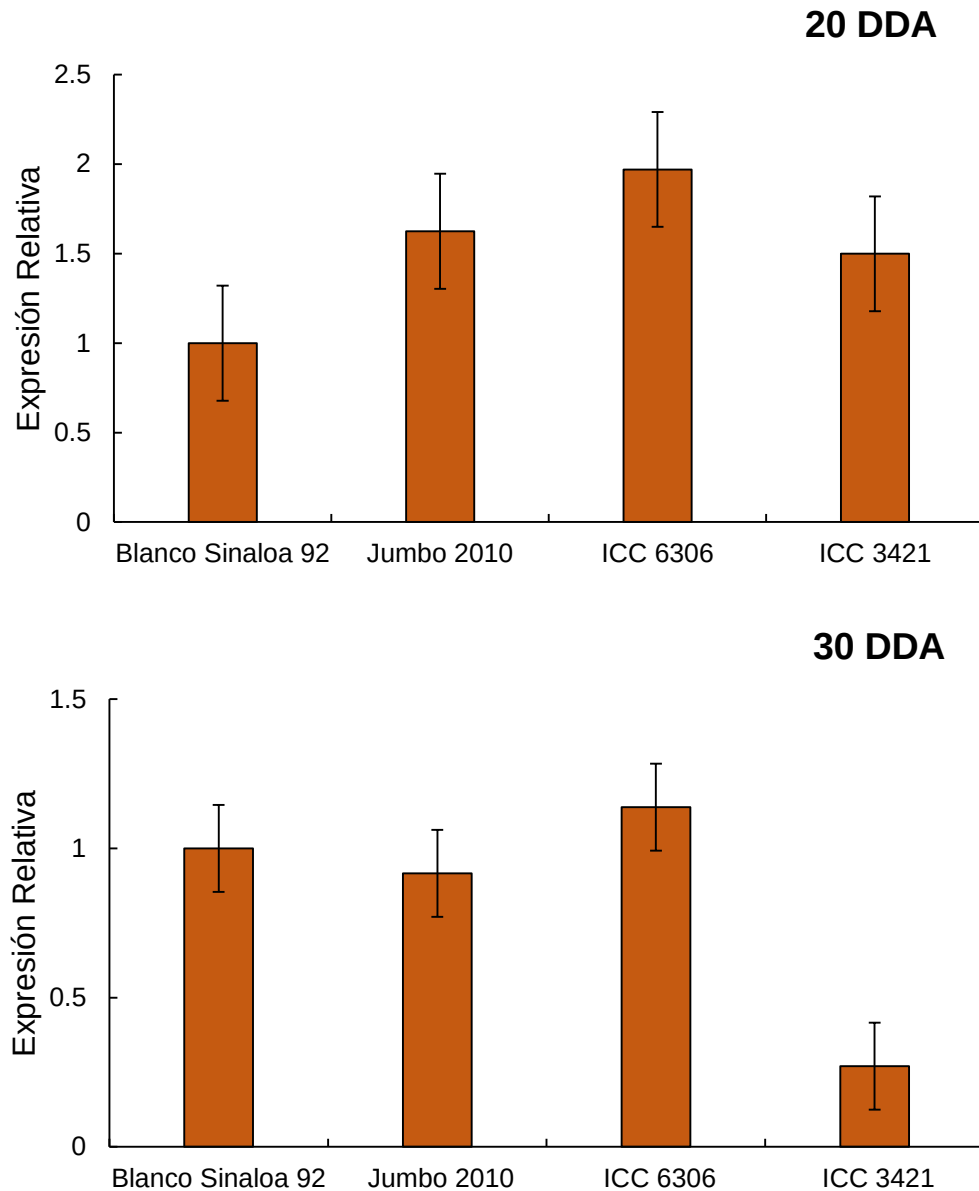


Figura 11. Expresión relativa del gen que codifica para la enzima almidón sintasa unida al gránulo en granos de garbanzo en desarrollo. La expresión de los genes se calculó utilizando al gen *eEF1A* como control y tomando como referencia el genotipo Blanco Sinaloa 92, cuyo nivel de expresión tomó el valor de 1. Las barras indican diferencias mínimas significativas ($P < 0.05$) basadas en la prueba de Fisher. 20 DDA (LSD=0.64); 30 DDA (LSD=0.29).

con la mayor acumulación de amilosa total que presentó ICC 6306 en esta etapa de desarrollo (Cuadro 8).

A los 30 DDA, el genotipo ICC 3421 mostró los menores niveles de expresión del gen para GBSSI, siendo el único significativamente menor de los cuatro genotipos estudiados (Figura 11). Sin embargo, los niveles de transcritos de este genotipo no coinciden con la acumulación de la enzima y amilosa, ya que si bien a los 30 DDA y en estado maduro fue uno de los que presentó el menor contenido de amilosa total, la acumulación de GBSSI en este genotipo fue alta. Esto puede estar relacionado con la mayor precocidad observada para este genotipo y por lo tanto, a 30 DDA podría estar en una etapa más avanzada de desarrollo de la semilla con respecto al resto de los genotipos, con la consiguiente disminución de los niveles de ARN.

2 Genes de proteínas de almacenamiento

a Lipoxigenasa

Lipoxigenasa es una de las proteínas más relevantes de la fracción de albúminas, ya que está relacionada con la síntesis de ácido jasmónico, el cual es responsable de la activación de genes durante la respuesta a daños en la planta. A los 20 DDA, los niveles de transcritos del gen que codifica para esta enzima fueron mayores en los genotipos desi con respecto a los kabuli, siendo ICC 6306 el que tuvo una expresión significativamente mayor (2.17 veces) al genotipo de referencia (Blanco Sinaloa 92) (Figura 12). Una mayor expresión de este gen podría estar relacionada a una mayor acumulación de la enzima, lo cual coincide con lo encontrado

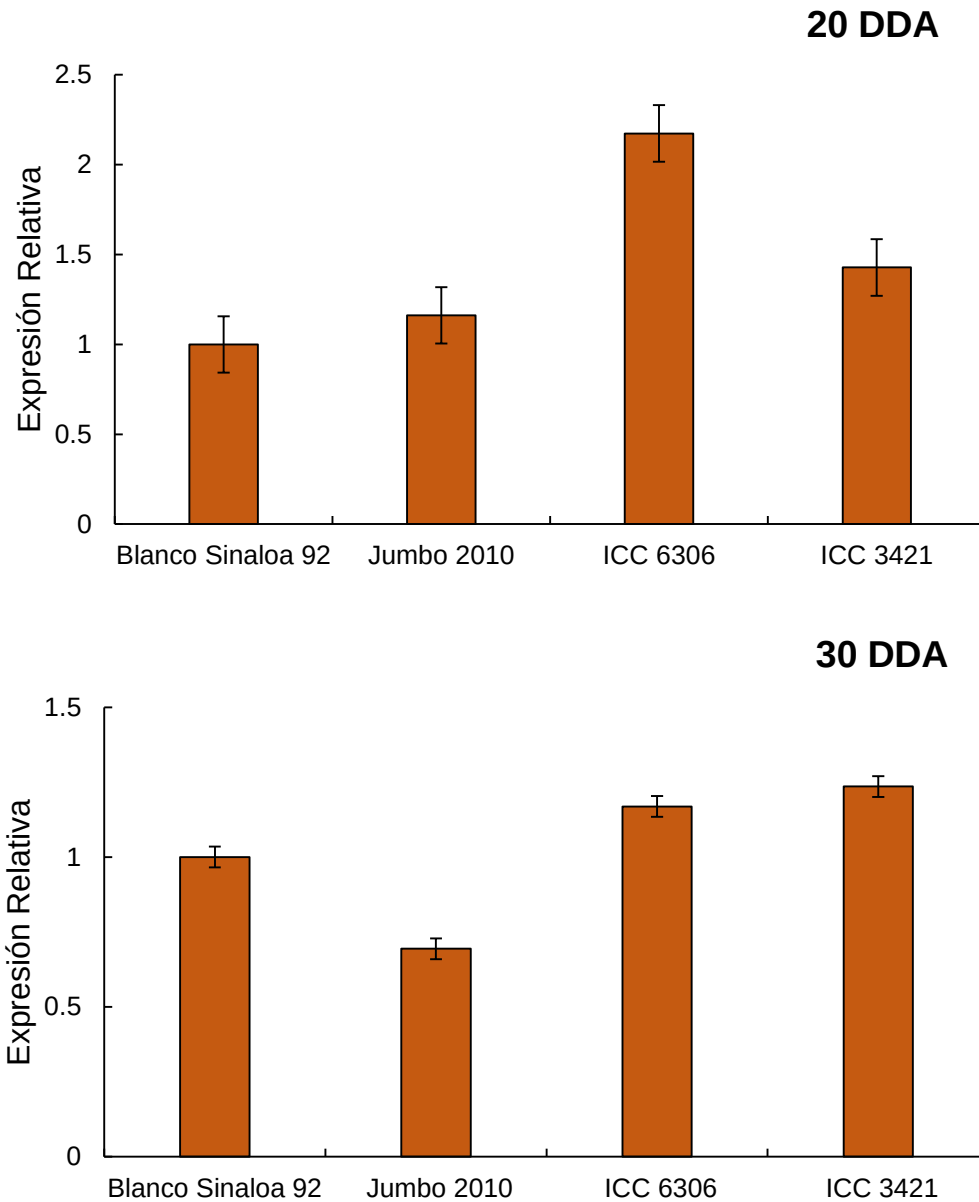


Figura 12. Expresión relativa del gen que codifica para la enzima lipoxigenasa en granos de garbanzo en desarrollo. La expresión de los genes se calculó utilizando al gen *eEF1A* como control y tomando como referencia el genotipo Blanco Sinaloa 92, cuyo nivel de expresión tomó el valor de 1. Las barras indican diferencias mínimas significativas ($P < 0.05$) basadas en la prueba de Fisher; 20 DDA (LSD=0.31), 30 DDA (LSD=0.06).

en este estudio ya que solo se pudo observar la presencia de esta proteína en los genotipos desi en esta etapa de desarrollo (Figura 7A).

A los 30 DDA se observó el mismo comportamiento mencionado anteriormente (Figura 12), ya que en este estado de desarrollo los genotipos desi mostraron niveles de expresión mayores que los genotipos kabuli, coincidiendo con la mayor acumulación de esta proteína en los genotipos desi en el mismo estado de desarrollo (Figura 7B, Cuadro 14).

Pradhan y col (2014) al realizar un análisis global del transcriptoma de garbanzo en desarrollo observaron que los niveles de transcritos del gen que codifica para la enzima lipoxigenasa fueron mayores en etapas de desarrollo tardías (30 y 40 DDA) respecto a etapas tempranas de desarrollo (10 y 20 DDA), esto podría relacionarse a la acumulación de esta proteína encontrada en el presente estudio observandose que a medida de que los días de desarrollo avanzaban, estos presentaban una mayor acumulación, hasta llegar al estado maduro y presentarse en los cuatro genotipos estudiados (Figura 7, Cuadro 13).

b Vicilina

Vicilina es una de las proteínas de almacenamiento más significativas de la fracción de globulinas. A los 20 DDA, los niveles de expresión del gen que codifica para esta proteína fueron significativamente mayores en el genotipo ICC 3421 (1.47 veces) que en Blanco Sinaloa 92 (Figure 13). De manera general, los genotipos desi mostraron niveles de expresión mayores que los kabuli. Mayores niveles de expresión de este gen sugieren una mayor acumulación de esta proteína. El análisis

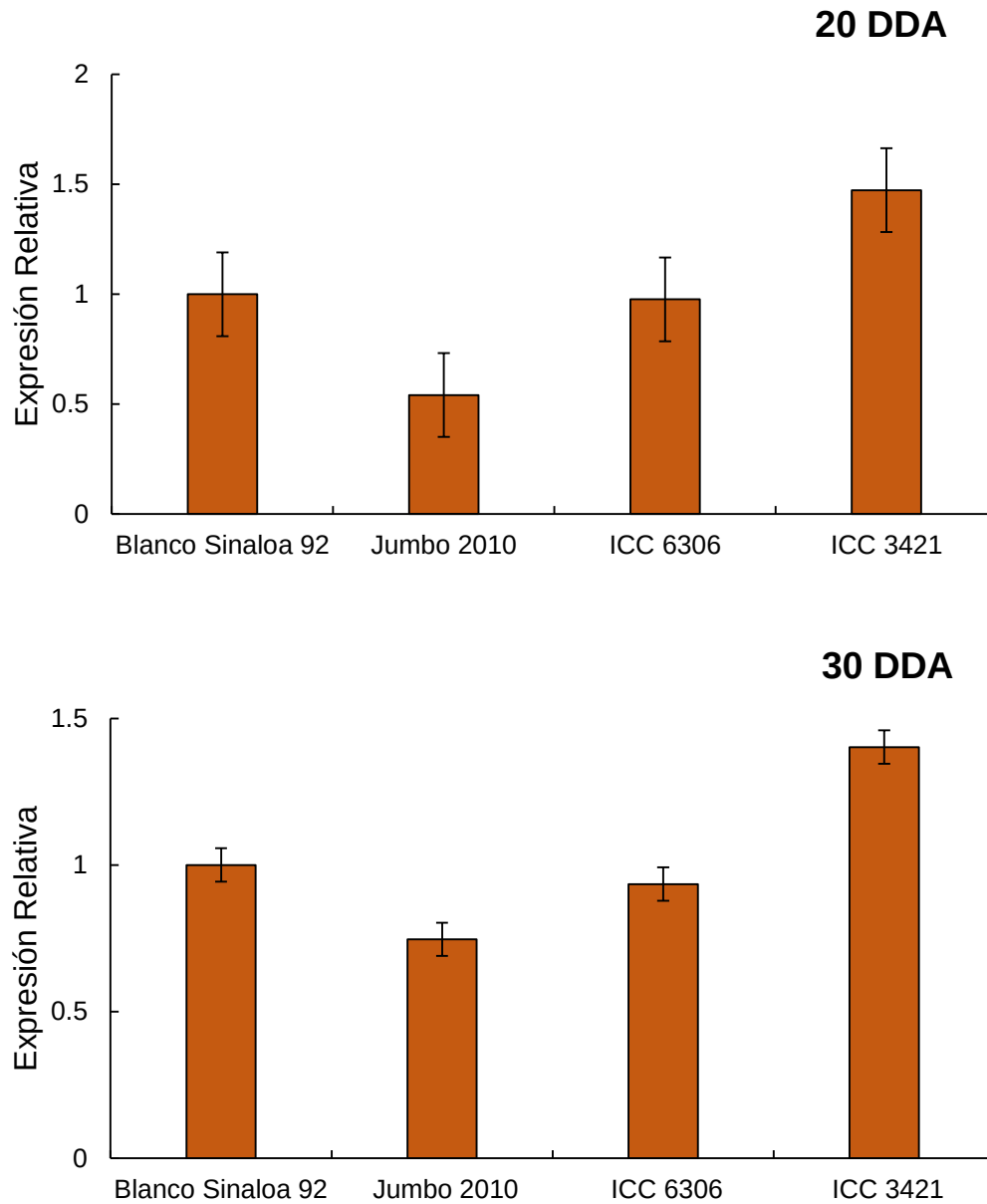


Figura 13. Expresión relativa del gen que codifica para la proteína de almacenamiento vicilina en granos de garbanzo en desarrollo. La expresión de los genes se calculó utilizando al gen *eEF1A* como control y tomando como referencia el genotipo Blanco Sinaloa 92, cuyo nivel de expresión tomó el valor de 1. Las barras indican diferencias mínimas significativas ($P < 0.05$) basadas en la prueba de Fisher; 20 DDA (LSD=0.38), 30 DDA (LSD=0.11).

densitométrico de esta proteína a los 20 DDA mostró que los genotipos estudiados presentaron una mayor acumulación (Figura 8A, Cuadro 16), coincidiendo con los niveles de transcritos.

A los 30 DDA, el genotipo ICC 3421 tuvo una expresión significativamente mayor que el genotipo de referencia (1.4 veces) y los otros genotipos estudiados (Figura 13). Del mismo modo este genotipo presentó la mayor acumulación de la proteína vicilina. Pradhan y col (2014) al realizar un análisis global del transcriptoma de garbanzo en desarrollo observaron que los niveles de expresión de este gen eran mayores en etapas de desarrollo tardías para un genotipo kabuli, es decir, a medida que el estado de desarrollo avanzaba de 20 a 40 DDA, lo cual corresponde con lo encontrado en el presente estudio, ya que en el genotipo Jumbo 2010 los niveles de expresión aumentaron respecto al genotipo de referencia a medida de que el estado de desarrollo avanzó de 20 a 30 DDA, lo cual también se observó con la acumulación de esta proteína.

c Legumina

Legumina es uno de los dos grandes grupos de proteínas que conforman la fracción de globulinas en garbanzo. A los 20 DDA, el análisis de expresión del gen para la legumina 11S subunidad α reveló una expresión significativamente mayor (2.45 veces) en el genotipo ICC 6306 con respecto al genotipo de referencia (Blanco Sinaloa 92) (Figura 14). La mayor expresión de este gen corresponde con la mayor acumulación observada de la legumina 11S subunidad α en este genotipo en el mismo estado de desarrollo (Figura 8A, Cuadro 16).

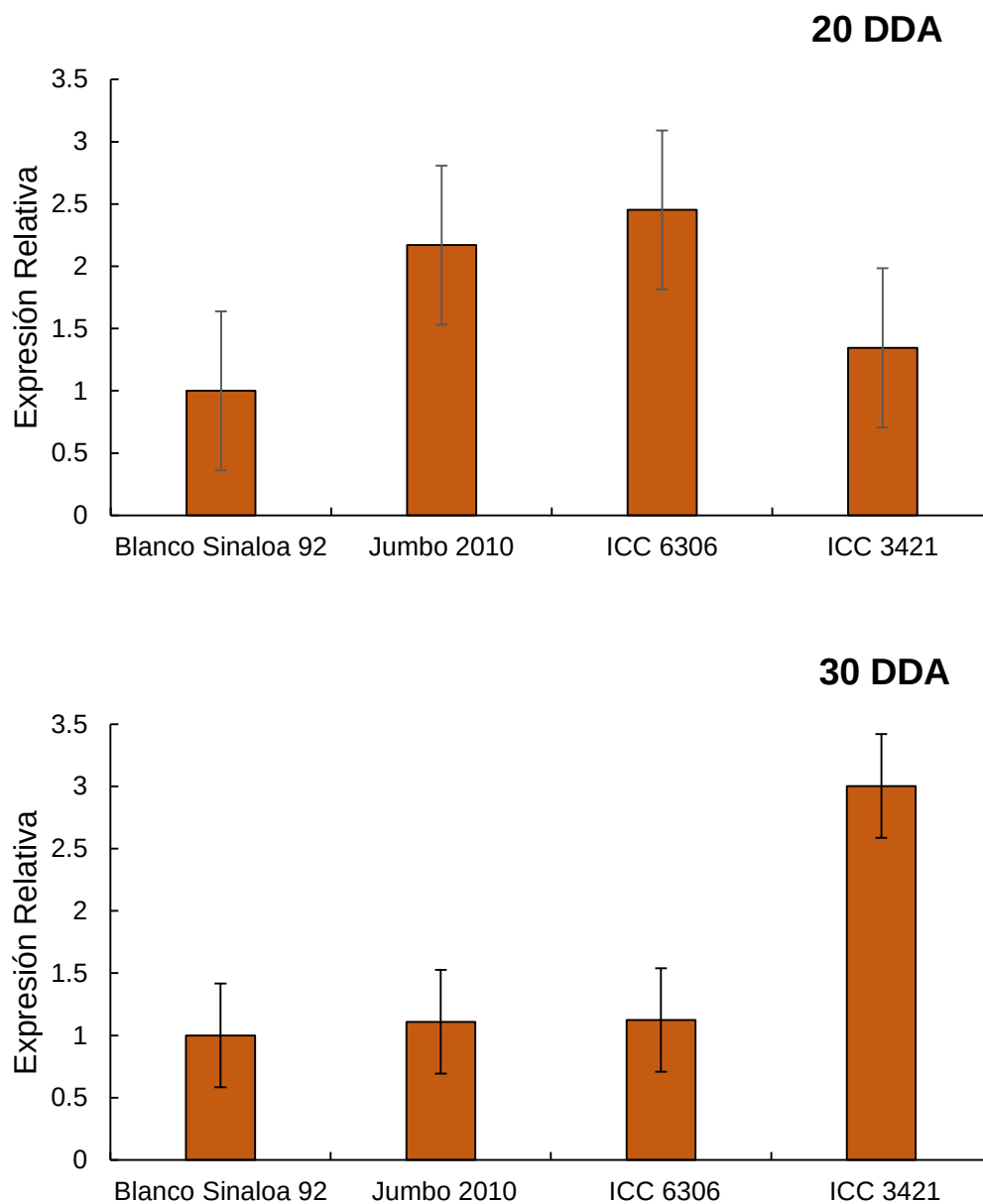


Figura 14. Expresión relativa del gen que codifica para la proteína de almacenamiento legumina en granos de garbanzo en desarrollo. La expresión de los genes se calculó utilizando al gen *eEF1A* como control y tomando como referencia el genotipo Blanco Sinaloa 92, cuyo nivel de expresión tomó el valor de 1. La barras indican diferencias mínimas significativas ($P < 0.05$) basadas en la prueba de Fisher; 20 DDA (LSD=1.27), 30 DDA (LSD=0.83).

Los niveles de transcritos a los 30 DDA mostraron que el genotipo ICC 3421 presentó una mayor expresión, siendo significativamente mayor (3 veces) con respecto al genotipo de referencia (Figura 14). La mayor expresión del gen corresponde con la mayor acumulación de la proteína legumina 11S subunidad α en este genotipo en el mismo estado de desarrollo.

IX CONCLUSIONES

- Los genotipos de garbanzo estudiados presentaron una amplia variabilidad en el contenido de almidón y sus componentes durante el desarrollo del grano. La variabilidad observada en estas propiedades sugiere diferencias estructurales importantes en el gránulo de almidón.
- Dentro de las proteínas asociadas al gránulo, la enzima almidón sintasa unida al gránulo (GBSSI) fue la más abundante y su acumulación se relacionó con el contenido de amilosa.
- Los perfiles de proteínas mostraron una mayor acumulación de la fracción de globulinas, con 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 lipoxigenasa y albúmina 2S.
- El análisis transcripcional de genes relacionados con la síntesis de amilopectina, isoamilasa (ISA) y enzima ramificadora de almidón (SBE), reveló una mayor expresión en los genotipos kabuli a los 30 DDA, lo cual correspondió con un mayor contenido de amilopectina en estos genotipos.
- Los genes para la enzima lipoxigenasa y la proteína legumina 11S se expresaron mayormente en los genotipos desi, lo cual correspondió con una mayor acumulación de estas proteínas.

- Los resultados indican que los niveles de expresión de los genes que codifican para las enzimas de síntesis de almidón y proteínas de almacenamiento se relacionan con la composición de almidón y la acumulación de sus respectivas proteínas, lo que sugiere el uso potencial de estos genes para desarrollar marcadores moleculares que puedan asistir en programas de mejoramiento de garbanzo.

X BIBLIOGRAFÍA

- Abbo S, Berger J, Turner NC. 2003. Evolution of cultivated chickpea: Four bottlenecks limit diversity and constrain adaptation. *Functional Plant Biology* 30:1081-1087.
- 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.
- Agama-Acevedo E, Juárez-García E, Evangelista-Lozano S, Rosales-Reynoso OL, Bello-Pérez LA. 2013. Characteristics of maize starch and relationship with its biosynthesis enzymes. *Agrociencia* 47:1-12.
- Agarwal G, Jhanwar S, Priya P, Singh VK, Saxena MS, Parida SK, Garg R, Tyagi AK, Jain M. 2012. Comparative analysis of kabuli chickpea transcriptome with desi and wild chickpea provides a rich resource for development of functional markers. *PLoS One* 7(12):1-14.
- Aguilera Y, Esteban RM, Benitez V, Molla E, Martin-Cabrejas MA. 2009a. Starch, functional properties, and microstructural characteristics in chickpea and lentil as affected by thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:10682-10688.
- Aguilera Y, Martín-Cabrejas MA, Díaz MF, Benítez V, Molla E, López-Andréu FJ, Esteban RM. 2009b. Changes in carbohydrate fraction during dehydration process of common legumes. *Journal of Food Composition and Analysis* 22:678–683.
- Amarowicz R, Pegg RB. 2008. Legumes as a source of natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology* 10:865-878.
- 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.infoaserca.gob.mx/claridades/marcos.asp?numero=42>

- Ashraf N, Ghai D, Barman P, Basu S, Gangisetty N, Mandal MK, Chakraborty N, Datta A, Chakraborty S. 2009. Comparative analyses of genotype dependent expressed sequence tags and stress-responsive transcriptome of chickpea wilt illustrate predicted and unexpected genes and novel regulators of plant immunity. *BMC Genomics* 10:415.
- 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.
- Ballicora MA, Laughlin MJ, Fu Y, Okita TW, Barry GF, Preiss J. 1995. Adenosine 5'-diphosphate-glucose pyrophosphorylase from potato tuber. Significance of the N terminus of the small subunit for catalytic properties and heat stability. *Plant Physiology* 109:245–251.
- Barrero PR. 2005. Aplicaciones de la técnica de microarrays en ciencias biomédicas: presente y futuro. *Química Viva* 4(3):91-100.
- Baud S, Boutin JP, Miquel M, Lepiniec L, Rochat C. 2002. An integrated over view of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry* 40:151–160.
- Baysal T, Demirdöven A. 2007. Lipoxygenase in fruits and vegetables: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 40:491-497.
- Bhatty RS. 1982. Albumin proteins of eight edible grain legume species: electrophoretic patterns and amino acid composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30:620–622.
- Borisjuk L, Rolletschek H, Radchuk R, Weschke W, Wobus U, Weber H. 2004. Seed development and differentiation, a role for metabolic regulation. *Plant Biology* 6:375–386.
- Buléon A, Gallant DJ, Bouchet B, Mouille G, D'Hulst C, Kossmann J, Ball S. 1998. Starches from A to C: *Chlamydomonas reinhardtii* as a model microbial system to investigate the biosynthesis of the plant amylopectin crystal. *Plant Physiology* 115:949-957.

- Burton RA, Bewley JD, Smith AM, Bhattacharyya MK, Tatge H, Ring S, Bull V, Hamilton WD, Martin C. 1995. Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development. *Plant Journal* 1:3-15.
- Buzzini P. 2001. Batch and fed-batch carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* +/- *Debaryomyces catellii* co-cultures in corn syrup. *Journal of Applied Microbiology* 90:843-847.
- Casey R, Domoney C, Smith AM. 1993. Biochemistry and molecular biology of seed products. En R. Casey & DR Davies (Ed.). *Peas: Genetics, molecular biology and biotechnology*. CAB International: Wallingford, UK. p 121–164.
- Chandler PM, Spencer D, Randall PJ, Higgs TJV. 1984. Influence of sulfur nutrition on developmental patterns of some major pea seed proteins and their mRNAs. *Plant Physiology* 75:651-657.
- Chang Y, Alli I, Konishe Y, Ziomek E. 2011. Characterization of protein fraction from chickpea (*Cicer arietinum* L.) and Oat (*Avena sativa* L.) seeds using proteomic techniques. *Food Research International* 44:3094-3104.
- Chang YW, Alli I, Molina AT, Konishi Y, Boye JI. 2012. Isolation and characterization of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed protein fractions. *Food Bioprocess Technology* 5:618–625.
- Chavan JK, Kadam SS, Salunkhe DK. 1989. Chickpea. En: *CRC Handbook of World Food Legumes: Nutritional chemistry, processing technology and utilization* CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, EUA 1:247-288.
- Chung HJ, Liu Q. 2009. Impact of molecular structure of amylopectin and amylose on amylose chain association during cooling. *Carbohydrate Polymers* 77:809-815.
- Chung HJ, Liu Q, Hoover R, Warkentin TD, Vandenberg B. 2008. In vitro starch digestibility, expected glycemic index, and thermal and pasting properties of flours from pea, lentil and chickpea a cultivars. *Food Chemistry* 111: 316–321.

- 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.
- Colonna P, Buleon A, LeMaguer M, Mercier C. 1982. *Pisum sativum* and *Vicia faba*. Carbohydrates. Part IV. Granular structure of wrinkled pea starch. *Carbohydrate Polymers* 2:43-59.
- 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.
- Coronel-Elenes F. 1980. Sistemas de producción del cultivo de garbanzo en el área de influencia del CIAPAN. Folleto Técnico No. 3, CEVACU, CIFAP-SIN, SARH, Culiacán, Sinaloa, México.
- Crinò P (curator). 1987. La coltura del cece in Italia. *Terra e Solè* 534:78–154.
- Crispín MA, López GH. 1976. El garbanzo: Un cultivo importante en México. CEVACU, CIFAP-SIN, SARH. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Culiacán, Sinaloa, México. Folleto No. 58.
- Defelice SL. 1995. The nutraceutical revolution, its impact on food industry research and development. *Trends in Food Science & Technology* 6:59-61.
- Deokar AA, Kondawar V, Jain PK, Karuppayil SM, Raju NL, Vadez V, Varshney RK, Srinivasan R. 2011. Comparative analysis of expressed sequence tags (ESTs) between drought-tolerant and –susceptible genotypes of chickpea under terminal drought stress. *BMC Plant Biology* 11:70.
- 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.
- 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.

- Duke JA. 1981. Handbook of legumes of world economic importance. Plenum Press, New York. 345 p.
- Dziuba J, Szerszunowicz I, Natecz D, Dziuba M. 2014. Proteomic analysis of albumin and globulin fractions of pea (*Pisum Sativum* L.) seeds. ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria 13(2):181-190.
- Eckert van R, Bond J, Rawson P, Klein CHL, Stern M, Jordan TW. 2010. Reactivity of gluten detecting monoclonal antibodies to a gliadin reference material. Journal of Cereal Science 51:198–204.
- FAOSTAT. Food Agriculture Organization. 2016. Database FAOSTAT. Disponible en: <http://faostat.fao.org> (Consultado en Marzo de 2016).
- Fratianni F, Cardinale F, Cozzolino A, Granese T, Albanese D, Di Matteo M, Zaccardelli M, Coppola R, Nazzaro F. 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.
- Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. Biotechniques 26:112–122.
- French D. 1984. Starch. En: Whistler RL, Bemiller JN, Parschall EF. Chemistry and Technology. New York: Academic Press p 183–247.
- Frimpong A, Sinha A, Tar'an B, Warkentin TD, Gossen BD, Chibbar RN. 2009. Genotype and growing environment influence chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed composition. Journal of Science Food and Agriculture 89:2052-2063.
- Gachon C, Mingam A, Charrier B. 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies?. Journal of Experimental Botany 55:1445–1454.
- Garg G, Sahoo A, Tyagi AK, Jain M. 2010. Validation of internal control genes for quantitative gene expression studies in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Biochemical and Biophysical Research Communications 396:283–288.

- Garg R, Jain M. 2013. Transcriptome Analyses in Legumes: A Resource for Functional Genomics. *The Plant Genome* 6(3):1-9.
- Garg R, Patel RK, Tyagi AK, Jain M. 2011. De novo assembly of chickpea transcriptome using short reads for gene discovery and marker identification. *DNA Research* 18:53–63.
- Gatel F, Champ M. 1998. Grain legumes in human and animal nutrition up to date results and question marks. En: 3rd European Conference on Grain Legumes. Opportunities for High Quality, Healthy and Added-Value Crops to Meet European Demands. European Association for Grain Legumes, ed. 14-19 November, 1998, Valladolid, España. p 7-11.
- Gil J, Nadal S, Luna D, Moreno MJ, De Haro A. 1996. Variability of some physico-chemical characteristics in “Desi” and “Kabuli” chickpea types. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71:179–184.
- Greene TW, Chantler SE, Kahn ML, Barry GF, Preiss J, Okita TW. 1996. Mutagenesis of the potato ADPglucose pyrophosphorylase and characterization of an allosteric mutant defective in 3-phosphoglycerate activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:1509–1513.
- 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.
- Grover A, Kapoor A, Satya O, Agarwal S, Sahi Ch, Katiyar S, Agarwal M, Dubey H. 2001. Understanding molecular alphabets of the plant abiotic stress responses. *Current Science* 80(2):206- 216.
- Gueguen J. 1991. Pea and fababean proteins. En B.J. F. Hudson (Ed.), *Development in food proteins*. Elsevier Applied Science: London, U.K. p 35–78.
- Guo M, Rupe MA, Zinselmeier C. 2004. Allelic variation of gene expression in maize hybrids. *The Plant Cell* 16:1707–1716.

- Güzel D, Sayar S. 2010. Digestion profiles and some physicochemical properties of native and modified borlotti bean, chickpea and white kidney bean starches. *Food Research International* 43:2132–2137.
- Han H, Baik BK. 2008. Antioxidant activity and phenolic content of lentils (*Lens culinaris*), chickpeas (*Cicer arietinum* L.), peas (*Pisum sativum* L.) and soybeans (*Glycine max*) and their quantitative changes during processing. *International Journal of Food Science and Technology* 43:1971-1978.
- Hauxwell AJ, Corke FNK, Hedley CL, Wang TL. 1990. Storage protein gene expression is localized to regions lacking mitotic activity in developing pea embryos. An analysis of seed development in *Pisum sativum*. *XIV Development* 110:283-289.
- Heiras-Palazuelos MJ, Ochoa-Lugo MI, Gutiérrez-Dorado R, López-Valenzuela JA, Mora-Rochín 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 Sciences and Nutrition* 64(1):69-76.
- 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.
- Hizukuri S, Takeda Y, Abe J, Hanashiro I, Matsunobu G, Kiyota H. 1997. Starch: Structure and Functionality. En: Frazier PJ, Richmond P, Donald AM, editors. London: Royal Society of Chemistry p 121-128.
- Holding DR, Hunter BG, Chung T, Gibbon BC, Ford CF, Bharti AK, Messing J, Hamaker BR, Larkins BA. 2008. Genetic analysis of *opaque-2* modifier loci in quality protein maize. *Theoretical and Applied Genetics* 117:157-170.
- Hoover R, Ratnayake WS. 2002. Starch characteristics of black bean, chickpea, lentil, navy bean and pinto bean cultivars grown in Canada. *Food Chemistry* 78:489–498.

- Hoover R, Sosulski FW. 1991. Composition, structure, functionality and chemical modification of legume starches: A review. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 69:79–92.
- Huang J, Schols HA, Van Soest JGG, Jin Z, Sulmann E, Voragen GJA. 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 E, Chibbar 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* 4:627-635.
- Huïsmán J, Van der Poel AFB. 1994. Aspects of the nutritional quality and use of cool season food legumes in animal feed. En: FJ Muehlbauer y WJ.Kaiser (Eds). *Proceedings of the Second International Food Legume Research Conference on pea, lentil, faba bean, chickpea, and grasspea. 12-16 de Abril de 1992. Cairo, Egipto. p 53-76. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.*
- Hussain H, Mant A, Seale R, Zeeman SC, Hinchliffe E, Edwards A, Hylton C, Bornemann S, Smith AM, Martin C, Bustos R. 2003. Three isoforms of isoamylase contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans. *Plant Cell* 15:133–149.
- ICRISAT. Instituto de Investigación de Cosechas Internacional para Zona Tropical Semiárida. 2016. Disponible en: <http://www.icrisat.org> (Consultado en Marzo de 2016).
- Jain M, Misra G, Patel RK, Priya P, Jhanwar S, Khan AW, Shah N, Singh VK, Garg R, Jeena G, Yadav M, Kant C, Sharma P, Yadav G, Bhatia S, Tyagi AK, Chattopadhyay D. 2013. A draft genome sequence of the pulse crop chickpea (*Cicer arietinum* L.). *The Plant Journal* 74(5):715-29.
- James MG, Denyer K, Myers AM. 2003. Starch synthesis in the cereal endosperm. *Physiology and Metabolism* 6:215–222.

- Jane J, Wong K, McPherson AE. 1997. Branch structure difference in starches of A and B type X-ray patterns revealed by their Naegelic dextrans. *Carbohydrate Research* 30(9):219–229.
- Jenkins DJA, Wolever TMS, Taylor RH, Barker HM, Fielder H. 1982. Exceptionally low blood glucose response to dried beans: comparison with other carbohydrate foods. *British Medical Journal* 281:578-585.
- Jeon JS, Ryoo N, Hahn TR, Walia H, Nakamura Y. 2010. Starch biosynthesis in cereal endosperm. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:383-392.
- Jhanwar S, Priya P, Garg R, Parida SK, Tyagi AK. 2012. Transcriptome sequencing of wild chickpea as a rich resource for marker development. *Plant Biotechnology Journal* 10:690–702.
- Jood S, Chauhan BM, Kapoor AC. 1988. Contents and digestibility of carbohydrates of chickpea and blackgram as affected by domestic processing and cooking. *Food Chemistry* 30:113–127.
- 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.
- Labdi M, Roberson LD, Singh KB, Charrier A. 1996. Genetic diversity and phylogenetic relationships among the annual *Cicer* species as revealed by isozyme polymorphism. *Euphytica* 88:181-188.
- Ladizinsky G. 1975. A new *Cicer* from Turkey. *Royal Botanic Garden Edinburgh* 34:201-202.
- Ladizinsky G, Adler A. 1976. Genetic relationships among the annual species of *Cicer* L. *Theoretical Applied Genetics* 48:197-203.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

- Li L, Blanco M, Jane J. 2007. Physicochemical properties of endosperm and pericarp starches during maize development. *Carbohydrate Polymers* 67:630-639.
- Liu RH. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *Journal Nutritional* 3479S-3485S.
- Lockhart D, Winzeler E. 2000. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 415:827-836.
- 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.
- Manners DJ, Matheson NK. 1981. The fine structure of amylopectin. *Carbohydrate Research* 90:99-110
- Mantri NL, Ford R, Coram TE, Pang EC. 2007. Transcriptional profiling of chickpea genes differentially regulated in response to high-salinity, cold and drought. *BMC Genomics* 8:303.
- Marguerat S, Bahler J. 2010. RNA-seq: from technology to biology. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67:569-579.
- Matveev YI, van Soest JJG, Nieman C, Wasserman LA, Protserov VA, Ezernitskaja, M, Yuryev VP. 2001. The relationship between thermodynamic and structural properties of low and high amylose maize starches. *Carbohydrate Polymers* 44:151-160.
- Meydani M. 2001. Nutrition interventions in aging and age-associated disease. En: *Annals of the New York Academy of Sciences* 928:226-235.
- Meyers B, Galbraith D, Nelson T, Agrawal V. 2004. Methods for transcriptional profiling in plants. Be fruitful and replicate. *Plant Physiology* 135:637-652.
- Mickowska B, Socha P, Urminská D, Cieslik E. 2013. Immunodetection, electrophoresis and amino acid composition of alcohol soluble proteins extracted from grains of selected varieties of pseudocereals, legumes, oat, maize and rice. *Cereal Research Communications* 41(1):160-169.

- Milán-Noris AK, de la Rosa-Millán J, Reyes-Moreno C, Serna-Saldivar SO. 2016. Physicochemical, functional properties, and digestion of isolated starches from pigmented chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Starch/Stärke* 68:1-11.
- Molina C, Rotter B, Horres R, Udupa SM, Besser B, Bellarmino L, Baum M, Matsumura H, Terauchi R, Kahl G, Winter P. 2008. SuperSAGE: the drought stress-responsive transcriptome of chickpea roots. *BMC Genomics* 9:553.
- Moreira AM, Hermodson MA, Larkins BA, Nielsen NC. 1979. Partial characterization of the acidic and basic polypeptides of glycinin. *Journal of Biological Chemistry* 19:9921–9926.
- Moreno M, Cubero JI. 1978. Variation in *Cicer arietinum* L. *Euphytica* 27:465–485.
- Müller-Rober B, Sonnewald U, Willmitzer L. 1992. Inhibition of the ADPglucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuberstorage protein genes. *EMBO Journal* 11:1229-1238.
- Muñoz F, Morán Zorzano M, Alonso-Casajús N, Baroja- Fernández E, Etxeberria E, Pozueta-Romero J. 2006. New enzymes, new pathways an alternative view on starch biosynthesis in both photosynthetic and heterotrophic tissues of plants. *Biocatalysis and Biotransformation* 24(1-2):63-76.
- Murray DR, Roxburgh C. 1984. Amino acid composition of the seed albumins from chickpea. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 35(8):893–896.
- Nakata PA, Greene TW, Anderson JM, Smith-White BJ, Okita TW, Preiss J. 1991. Comparison of the primary sequences of the two potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase subunits. *Plant Molecular Biology* 17:1089–1093.
- Newman CW, Roth NR, Lockerman RH. 1987. Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Nutrition Reports International* 36:1-5.
- Okita TW. 1992. Is there an alternative pathway for starch synthesis?. *Plant Physiology* 100:560-564.

- Okita TW, Nakata PA, Anderson JM, Sowokinos J, Morell M, Preiss J. 1990. The subunit structure of potato-tuber ADPglucose pyrophosphorylase. *Plant Physiology* 93:785–790.
- Peat S, Whelan WJ, Thomas GJ. 1952. Evidence of multiple branching in waxy maize starch. *Journal of the Chemical Society* 4546-4548.
- Pérez-Grau L, Goldberg RB. 1989. Soybean seed protein genes are regulated spatially during embryogenesis. *Plant Cell* 1:1095-1109.
- Pennington JAT, Fisher R. 2010. Foods components profiles for fruits and vegetable subgroups. *Journal of Food Composition and Analysis* 23:411-418.
- Pittaway J. 2006. Chickpeas and Human Health: The effect of chickpea consumption on some physiological and metabolic parameters. [Tesis de Maestría]. Universidad de Tasmania, Australia. 140 p.
- Pradhan S, Bandhiwal N, Shah N, Kant C, Gaur R, Bhatia S. 2014. Global transcriptome analysis of developing chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *Frontiers in Plant Science* 5:1-14.
- Preiss J. 1988. Biosynthesis of starch and its regulation. En J Preiss, ed, *The Biochemistry of Plants*, Vol 14. Academic Press, San Diego, CA. p 181-254.
- Quintero-Soto MF. 2015. Identificación de marcadores moleculares asociados al contenido de proteínas, almidón y fitoquímicos en genotipos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.). [Tesis de Maestría]. Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Culiacán, Sinaloa. México. 131 p.
- Reifen R. 2002. Vitamin A as an anti inflammatory agent. *Proceedings of the Nutrition Society* 3:397–400.
- Reyes-Moreno C, Okamura-Esparza J, Armienta-Rodelo E, Gómez-Garza RM, Milán-Carrillo J. 2000. Hard-to-cook phenomenon in chickpeas (*Cicer arietinum* L.): Effect of accelerated storage on quality. *Plant Foods for Human Nutrition* 55:229-241.

- Rizkalla SW, Bellisle F, Slama G. 2002. Health benefits of low glycemic index foods, such as pulses, in diabetic patients and health individuals. *British Journal of Nutrition* 88:S255–S262.
- Ruíz RA, Marin FR, Ocaña A, Soler-Rivas C. 2008. Effect of domestic processing on bioactive compounds. *Phytochemistry Reviews* 7:345-384.
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2016. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola, México. Disponible en: <http://www.siap.sagarpa.gob> (Consultado en Marzo de 2016).
- Salazar-Salas NY, Pineda-Hidalgo KV, Chavez-Ontiveros J, Gutierrez-Dorado R, Reyes-Moreno C, Bello-Pérez LA, Larkins BA, Lopez-Valenzuela JA. 2014. Biochemical characterization of QTLs associated with endosperm modification in quality protein maize. *Journal of Cereal Science* 60:255-263.
- 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.
- Sandhu KS, Lim S. 2008. Digestibility of legume starches as influenced by their physical and structural properties. *Carbohydrate polymers* 71:245–252.
- 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. Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Culiacán, Sinaloa, México. 87 p.
- Sathe SK, Mason AC, Weaver CM. 1987. Thermal aggregation of soybean (*Glycine max* L.) sulphur rich protein. *Journal of Food Science* 54:319-323.

- Schena M, Heller R, Theriault T, Konrad K, Lachenmeier E, Davis R. 1998. Microarrays: Biotechnology's Discovery Platform for Functional Genomics. Trends Biotechnology 16:301-306.
- Seferoglu AB, Baris I, Morgil HC, Tulum I, Ozdas SA, Cevahir G, Kavakli IH. 2013. Transcriptional regulation of the ADP-glucose pyrophosphorylase isoforms in the leaf and the stem under long and short photoperiod in lentil. Plant Science 205–206:29–37.
- Segev A, Badani H, Kapulnik Y, Shomer I, Oren-Shamir M, Galili S. 2010. Determination of polyphenols, flavonoids, and antioxidant capacity in colored chickpea (*Cicer arietinum* L.). Journal of food science 75(2):S115-S119.
- Sethy NK, Chaudhary S, Shokeen B, Bhatia S. 2006. Identification of microsatellite markers from *Cicer reticulatum*: molecular variation and phylogenetic analysis. Theoretical and Applied Genetics 112(2):347-357.
- Shalon D, Smith S, Brown P. 1996. A DNA Microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. Genome Research 6:639-645.
- 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.
- Shannon JC, Garwood DL. 1984. Genetics and physiology of starch development. En Starch: Chemistry and Technology, R.L. Whistler, J.N. BeMiller, y E.F. Paschall, (Eds) (Orlando, FL: Academic Press). p 25-86.
- Shotwell MA, Afonso C, Davies E, Chesnut RS, Larkins BA. 1988. Molecular characterization of oat seed globulins. Plant Physiology 87(3):698–704.
- Singh KB. 1990. Prospects of developing new genetic material and breeding methodologies for chickpea improvement. Options Méditerranéennes - Série A. Séminaires Méditerranéennes 9:43–50.

- Singh KB. 1997. Chickpea (*Cicer arietinum* L.). Field Crops Research 53:161–170.
- Singh KB, O'Campo B. 1997. Exploitation of wild *Cicer* species for yield improvement in chickpea. CAB international, Wallingford, UK. p 127-162.
- Singh N, Sandhu KS, Kaur M. 2004. Characterization of starches separated from Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. Journal of Food Engineering 63:441–449.
- Singh N, Sekhon KS, Bajwa U, Gopal S. 1992. Cooking and parching characteristics of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Journal of Food Science and Technology 29:347–350.
- Singh R, Sharma P, Varshey RK, Sharma SK, Singh NK. 2008. Chickpea improvement: role of wild species and genetic markers. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 25:267-314.
- Singh U. 1985. Nutritional quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.): current status and future research needs. Plant Foods Human Nutrition 35:339-35.
- Singh U, Jambunathan 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.
- Smith AM, Martin C. 1993. Starch biosynthesis and the potential for its manipulation. In Biosynthesis and Manipulation of Plant Products, Plant Biotechnology Series, Vol. 3, D. Grierson, ed (Glasgow: Blackie Academic and Professional Publishers). p 1-54.
- Smith-White BJ, Preiss J. 1992. Comparison of proteins of ADPglucose pyrophosphorylase from diverse sources. Journal of Molecular Evolution 34:449-464.
- Soto-López OA. 2015. Análisis de la expresión de genes de síntesis de almidón y su relación con la modificación de la dureza del endospermo de maíz de calidad proteínica [Tesis de Maestría]. Culiacán, Sinaloa: Universidad Autónoma de Sinaloa. 130 p.

- Soto-Sedano JC, Lopez-Carrascal CE, 2012. RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad* 16(2):101-113.
- 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.
- Takaiwa F, Ogawa M, Okita TW. 1999. Rich glutelins. En Shewry PR and Casey R (Eds). *Seed proteins* p 401–425. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Tanksley SD. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology* 1:3-8.
- Tanno KI, Willcox G. 2006. The origins of cultivation of *Cicer arietinum* L. and *Vicia faba* L.: early finds from Tell el-Kerkh, North-west Syria, Late 10th Millennium B. P. *Vegetation History Archaeobotany* 15:197-2004.
- Tavano OL, Neves VA. 2008. Isolation, solubility and in vitro hydrolysis of chickpea vicilin-like protein. *Food Science and Technology* 41:1244–1251.
- Taylor PWJ, Ford R. 2007. Genome mapping and molecular and molecular breeding in plants. Kole, C (Ed.) Vol. 3. *Pulses, Sugar and Tuber Crops*. p 109-118. Springer.
- Tester RF, Karkalas J. 2002. Starch: Biopolymers. Polysaccharides. En: Steinbüchel A, Vandamme EJ, de Beats S, Steinbüchel A editores. *II Polysaccharides from Eukaryote*. Vol. 6. Wiley-VCH: Weinheim. p 328-438.
- Tester RF, Morrison WR. 1990. Swelling and gelatinization of cereal starches. *Cereal Chemistry* 67:558-563.
- Tetlow IJ, Morrell MK, Ernes MJ. 2004a. Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *Journal of Experimental Botany* 55:2131-2145.

- Tetlow IJ, Wait R, Lu Z, Akkasaeng R, Bowsher CG, Esposito S, Kosar-Hashemi B, Morell MK, Emes MJ. 2004b. Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein–protein interactions. *The Plant Cell* 16:694-708.
- Tirosh I, Reikhav S, Levy AA, Barkai N. 2009. A yeast hybrid provides insight into the evolution of gene expression regulation. *Science* 324:659–662.
- Tofiño A, Romero HA, Ceballos H. 2007. Efecto del estrés abiótico sobre la síntesis y degradación de almidón. Una revisión. *Agronomía Colombiana* 25(2):245-254.
- Torres-Fuentes C, Alaiz M, Vioque J, 2011. Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry* 129:485-490.
- Trethewey RN, Smith AM. 2000. Starch metabolism in leaves. *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Dordrecht, Holanda: Springer 9:205–231.
- Uma-Reddy M, Pushpamma P. 1986. Effect of storage on amino acid and biological quality of proteins in different varieties of pigeon pea, green gram and chickpea. *Nutrition Reports International* 33:1020-1029.
- Upadhyaya HD, Thudi M, Dronavalli N, Gujaria N, Singh S, Sharma S, Varshney RK. 2011. Genomic tools and germplasm diversity for chickpea improvement. *Plant Genetic Resources* 9(1):45-58.
- Van der Maarel MJEC, Van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *Journal of Biotechnology* 94:137-155.
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME. 2005. Genomic-assisted breeding for crop improvement. *Trends in Plant Science* 10:621-30.
- Varshney RK, Horres R, Molina C, Nayak S, Jungmann R, Swamy P, Winter P, Jayashree B, Kahl G, Hoisington DA. 2007. Extending the repertoire of microsatellite markers for genetic linkage mapping and germplasm screening in chickpea. *Journal of SAT Agricultural Research* 5:1-3.

- Varshney RK, Song C, Saxena RK, Azam S, Sheng Y, Sharpe AG, Cannon S, Baek J, Rosen BD, Taran 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, Lichtenzveig 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. 2013. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. *Nature Biotechnology* 31:240–246.
- Vioque J, Clemente A, Sánchez-Vioque R, Pedroche J, Bautista J, Millán F. 1998. Comparative study of chickpea and pea PA2 albumins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:3609-3613.
- 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.
- Ward J, Ponnala L, Weber C. 2012. Strategies for transcriptome analysis in nonmodel plants. *American Journal of Botany* 99(2):267-276.
- Weber H, Borisjuk L, Wobus U. 2005. Molecular physiology of legume seed development. *Annual Review of Plant Biology* 56:253–279.
- Wood JA, Grusak MA. 2007. Nutricional value of chickpea. En: Yadav SS., Redden R., Chen W., Sharma B. (Eds). *Chickpea Breeding and Management*. p 101. Cabi Internacional ISBN-13:9871845932145, Cambridge, EUA.
- Xu BJ, Chang SKC. 2007. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science* 72(2):S159-S166.
- Youle RJ, Huang AHC. 1981. Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oil seeds of diverse species. *American Journal of Botany* 68:44-48.

- 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.
- Yust M, Pedroche M, Girón-Calle J, Alaiz M, Millán F, Vioque J. 2003. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chemistry* 81:363-369.
- Zaccardelli M, Sonnante G, Lupo F, Piergiovanni AR, Laghetti G, Sparvoli F, Lioi L. 2013. Characterization of Italian chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm by multidisciplinary approach. *Genetic Resources and Crop Evolution* 60:865–877.
- Zeeman SC, Kossmann J, Smith AM. 2010. Starch: Its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annual Review of Plant Biology* 61:209-234.
- Zeeman SC, Smith SM, Smith AM. 2007. The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochemical Journal* 401:13-28.
- Zhang G, Ao Z, Hamaker BR. 2006. Slow digestion property of native cereal starches. *Biomacromolecules* 7:3252–3258.
- Zhang T, Li YH, Miao M. 2011. Purification and characterisation of a new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietium* L.) protein hydrolysates. *Food Chemistry* 128:28-33.

ABREVIATURAS

%R	Porcentaje de retrogradación
ΔH_g	Entalpía de gelatinización
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP-Glu	ADP-Glucosa
AGPasa	ADP- glucosa pirofosforilasa
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ATP	Adenosin trifostato
ConA	Concanavalina A
Ct	Ciclo umbral de expresión
DBE	Enzimas desramificadoras del almidón
DDA	Días después de la antesis
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPS	Mezcla de nucleótidos
DTT	Ditiotreitol
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
GBSS	Almidón sintasa unida al gránulo
GOPOD	Glucosa oxidasa peroxidasa
ICRISAT	Instituto Internacional de Investigación de Cultivos para Zonas Tropicales Semiáridas
ID	Identificación
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias
ISA	Isoamilasa
KDa	Kilodalton(es)
LC/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
LEG	Gen para la proteína legumina

LOX	Gen para la proteína lipoxigenasa
PAG	Proteínas asociadas al gránulo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo rela
S	Sedimentación
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SBE	Enzimas ramificadoras del almidón
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
SS	Almidón sintasas solubles
Ton	Toneladas
T _p G	Temperatura pico de gelatinización
VIC	Gen para la proteína vicilina