

IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Proteómica comparativa de especies silvestres y domesticadas
de *Amaranthus*: *A. hybridus*, *A. powellii*, *A. cruentus* y *A.
hypochondriacus***

Tesis que presenta
Esaú Bojórquez Velázquez

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

San Luis Potosí, S.L.P., julio de 2015



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “*Proteómica comparativa de especies silvestres y domesticadas de Amaranthus: A. hybridus, A. powellii, A. cruentus y A. hypochondriacus*” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Esaú Bojórquez Velázquez** y aprobada el **10 de julio del dos mil quince** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Directora de la tesis

Dra. Martha Leticia Santos Martínez
Miembro del Comité Tutorial

Dr. José Ángel Huerta Ocampo
Miembro del Comité Tutorial

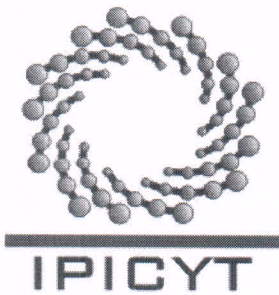


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 298096) gestionada por el Departamento de Posgrado del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

El autor de recibió una beca por parte de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación científica y Tecnológica A.C. (Clave de tipo de apoyo para integrar en el SIIPP-G "064"), para la presentación de éste trabajo en el 6to. Simposio de Espectrometría de Masas, a llevarse a cabo del 8 al 12 de noviembre de 2015, en Puerto Vallarta, Jalisco. México.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 132 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 10 días del mes de julio del año 2015, se reunió a las 12:05 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Martha Leticia Santos Martínez

Presidenta

IPICYT

Dr. José Ángel Huerta Ocampo

Secretario

CIAD

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

Sinodal

IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Esaú Bojórquez Velázquez

sobre la Tesis intitulada:

*Proteómica comparativa de especies silvestres y domesticadas de **Amaranthus**: **A. hybridus**, **A. powellii**, **A. cruentus** y **A. hypochondriacus***

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 13:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 10 días del mes de julio de 2015.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatoria

A mis padres y hermanos

A Miriam por estar siempre a mi lado

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa por la dirección y apoyo en este trabajo y su incansable labor por incursionar en las fronteras de la proteómica.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Martha Leticia Santos Martínez, y Dr. José Ángel Huerta Ocampo, por sus valiosas aportaciones a esta tesis.

Al M. en C. Alberto Barrera Pacheco, Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular, División de Biología Molecular, IPICYT

A la Dra. Olga Araceli Patrón Soberano, Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología-LINAN, IPICYT

Al M. en C. Abraham Escobedo Moratilla, estudiante de doctorado en el Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular, División de Biología Molecular, IPICYT

A Antonio Castellanos Martínez, Centro Nacional de Supercomputo-CNS, IPICYT

CONACYT-MEXICO GRANT 56787 (Laboratory for Nanoscience and Nanotechnology Research-LINAN), y Proyecto INFRA-2013-01 No. 204373

Contenido

Constancia de aprobación de tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos.....	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras.....	ix
Resumen.....	x
ABSTRACT	xi
1. Introducción.....	1
2. Materiales y métodos	3
2.1 Material biológico	3
2.2 Extracción de proteína	3
2.3 Separación electroforética de las proteínas de amaranto	5
2.4 Aislamiento y tinción de glicoproteínas	6
2.5 Digestión en gel y análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).....	7
2.6 Identificación de proteínas	8
2.7 Microscopía electrónica de barrido	9
2.8 Electroforesis 2D.....	9
3. Resultados y discusión.....	10
3.1 Extracción y cuantificación de proteína.....	10
3.2 Electroforesis comparativa de las proteínas de las cuatro especies de amaranto.....	12
3.3 Identificación de proteínas	14
3.3.1 Proteínas identificadas en la fracción hidrofílica	14
3.3.2 Proteínas identificadas en la fracción hidrofóbica.....	25
3.3.3 Proteínas de reserva.....	29
3.3.4 Glicoproteínas.....	31
4. Perspectivas.....	37
5. Conclusiones.....	39
Referencias	41
ANEXOS	48

Lista de tablas

Tabla 1. Proteínas identificadas con relación a estructura y mecánica celular.....	16
Tabla 2. Proteínas identificadas con relación a respuesta a estrés oxidante	18
Tabla 3. Proteínas identificadas con relación a respuesta a estrés térmico	21
Tabla 4. Proteínas LEA identificadas	24
Tabla 5. Sintetas de almidón acopladas a gránulo identificadas en las semillas de amaranto	26
Tabla 6. Identificación de glicoproteínas en las fracciones hidrofílica e hidrofóbica de las semillas de las cuatro especies de amaranto	35
Tabla Suplementaria S1. Análisis estadístico del contenido de proteína de las semillas de las cuatro especies de amaranto determinado por el método de Bradford	49
Tabla Suplementaria S2. Identificación de proteínas en la fracción hidrofílica de las semillas de <i>A. hybridus</i> , <i>A. powellii</i> , <i>A. cruentus</i> y <i>A. hypochondriacus</i>	50
Tabla Suplementaria S3. Identificación de proteínas en la fracción hidrofóbica de las semillas de <i>A. hybridus</i> , <i>A. powellii</i> , <i>A. cruentus</i> y <i>A. hypochondriacus</i>	55
Tabla Suplementaria S4. Identificación de glicoproteínas en las fracciones hidrofílica e hidrofóbica de las semillas de <i>A. hybridus</i> , <i>A. powellii</i> , <i>A. cruentus</i> y <i>A. hypochondriacus</i>	59

Lista de figuras

Figura 1. Semillas de las cuatro especies de amaranto	4
Figura 2. Contenido de proteína de las semillas de las cuatro especies de amaranto determinado por el método de Bradford.....	11
Figura 3. Perfil electroforético comparativo de las fracciones hidrofílica e hidrofóbica de las cuatro especies de amaranto.....	13
Figura 4. Resolución de los extractos proteínicos de las semillas de las cuatro especies de amaranto en un formato electroforético de mayor tamaño.....	15
Figura 5. Micrografías tomadas mediante microscopia electrónica de barrido de cortes transversales de las semillas de las cuatro especies de amaranto.....	28
Figura 6. Glicoproteínas aisladas de la fracción hidrofílica de las cuatro especies de amaranto mediante cromatografía de afinidad a lectinas.....	32
Figura 7. Glicoproteínas aisladas de la fracción hidrofóbica de las cuatro especies de amaranto mediante cromatografía de afinidad a lectinas.....	33
Figura 8. Perfil 2DE de la fracción hidrofílica de <i>A. hybridus</i> en rangos de pH 3-10 y 4-7.....	38
Figura Suplementaria S1. Perfil 2DE de la fracción hidrofílica de <i>A. powellii</i> en rangos de pH 3-10 y 4-7.....	61
Figura Suplementaria S2. Perfil 2DE de la fracción hidrofílica de <i>A. cruentus</i> en rangos de pH 3-10 y 4-7.....	62
Figura Suplementaria S3. Perfil 2DE de la fracción hidrofílica de <i>A. hypochondriacus</i> en rangos de pH 3-10 y 4-7.....	63

Resumen

Proteómica comparativa de especies silvestres y domesticadas de *Amaranthus*: *A. hybridus*, *A. powellii*, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*

El amaranto es un cultivo valorado por la buena calidad de la proteína de su semilla. El género *Amaranthus* está formado por 70 especies con gran variabilidad genética, y existen numerosos reportes enfocados en la descripción de su filogenia con base en sus secuencias de DNA, sin embargo no se han reportado estudios relacionados al análisis de las proteínas de sus semillas. Este trabajo reporta la comparación proteómica y glicoproteómica mediante electroforesis en una dimensión y espectrometría de masas, de las semillas de las especies domesticadas *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* y sus ancestros silvestres *A. hybridus* y *A. powellii*. El mayor contenido de proteína total se obtuvo para la especie silvestre *A. powellii*. Se empleó un enfoque de extracción diferencial para analizar las proteínas de las semillas de las cuatro especies de amaranto. En la fracción hidrofílica se encontraron acumuladas diferencialmente proteínas relacionadas con mecánica y estructura celular, proteínas involucradas con resistencia a estrés por choque térmico, estrés oxidante y proteínas tipo LEA, más abundantes en las especies silvestres de amaranto. En la fracción hidrofóbica de las cuatro especies se encontraron isoformas distintas de sintasas de almidón acopladas a gránulo, enzimas clave en la determinación de la calidad de los gránulos de almidón. No se encontraron diferencias en los perfiles electroforéticos de glicoproteínas aisladas a partir de la fracción hidrofílica de las semillas de las cuatro especies de amaranto mediante cromatografía de afinidad a lectinas en paralelo. La identificación de estas glicoproteínas indica que una fracción de la globulina 11S de amaranto está glicosilada, proteína que además fue identificada en distintas bandas de las fracciones hidrofílica e hidrofóbica de las cuatro especies de amaranto. Estos resultados indican que la variabilidad en las semillas de las especies de amaranto no se limita a un nivel genético, sino que también existe a nivel proteómico, debido probablemente, además de las diferencias en el genoma, a mecanismos distintos de acumulación e incorporación de modificaciones postraduccionales.

Palabras clave: Acumulación diferencial, variabilidad genética, resistencia a estrés abiótico, sintasas de almidón acopladas a gránulo, glicoproteómica.

ABSTRACT

Comparative proteomics of wild and cultivated *Amaranthus* species: *A. hybridus*, *A. powellii*, *A. cruentus* and *A. hypochondriacus*

Amaranth is a highly valued crop due to its good seed-protein quality. The *Amaranthus* genus is composed of 70 species with high genetic variability among its members. There are numerous reports focused on describing their phylogeny based on their DNA sequences, but there are no published studies related to the analysis of amaranth seed proteins. Here reports comparative proteomics and glycoproteomics carried out by one-dimensional electrophoresis and mass spectrometry analysis of seed proteins of domesticated amaranth species *A. cruentus* and *A. hypochondriacus*, and their wild ancestors *A. hybridus* and *A. powellii* is reported. The highest content of total protein was obtained for the wild species *A. powellii*. Differential extraction approach was used to analyze the seed proteins from the four amaranth species. The hydrophilic fraction contains differentially accumulated proteins related to structure and cell motion, resistance to heat shock stress, oxidative stress and LEA-like proteins, which were more abundant in wild amaranth species. Whereas in the hydrophobic fraction of all four amaranth seed species, different isoforms of granule bound starch synthases, key enzymes in determining the quality of the starch granules were found. No differences were found in the electrophoretic profiles of glycoproteins isolated by in parallel lectin affinity chromatography from the four species hydrophilic fraction. Amaranth 11S globulin was found glycosylated, and also identified in different bands in both hydrophilic and hydrophobic fractions of the four seeds species. The results indicate that variability in seeds of amaranth species is not limited at the genetic level, but also at proteomic levels, probably due, in addition to genomic differences, to different protein accumulation mechanisms and posttranslational modifications.

Key words: Differential accumulation, genetic variability, abiotic stress resistance, granule bound starch synthase, glycoproteomics.

1. Introducción

El amaranto fue un cultivo de gran importancia para los pueblos azteca, maya e inca, pero su producción declinó con el colapso de estas civilizaciones después de la llegada de los españoles, pues su cultivo fue prohibido al verse vinculado con la realización de ceremonias paganas. Sin embargo, en las dos últimas décadas ha renacido como un cultivo alternativo por sus características nutricionales y nutracéuticas (Silva-Sánchez et al. 2008; Barba de la Rosa et al., 2010; Maldonado-Cervantes et al., 2010; Velarde-Salcedo et al., 2013). La relevancia del amaranto como un cultivo atractivo para la alimentación humana, radica principalmente en la calidad de su proteína ya que a diferencia de los cereales, su contenido de prolaminas, las proteínas de reserva responsables de la manifestación de la enfermedad celiaca, es mínimo o prácticamente nulo. La semilla de amaranto es particularmente rica en lisina, aminoácido deficiente en cereales y contiene niveles adecuados de aminoácidos esenciales respecto a los requerimientos nutricionales establecidos por la FAO y la OMS, mejor balanceados que los contenidos de aminoácidos esenciales de cereales y leguminosas (Bressani y García-Vela, 1990; Alvarez-Jubete et al., 2010; Huerta-Ocampo y Barba de la Rosa, 2011; Valcárcel-Yamani y Caetano da Silva Lannes, 2012). Además de la buena calidad nutricional de sus semillas, la planta de amaranto es naturalmente resistente a diversos tipos de estrés abiótico como sequía, calor y salinidad (Aguilar-Hernández et al., 2011; Huerta-Ocampo et al., 2010; 2014). El género *Amaranthus* consta de alrededor de 70 especies, de las cuales 40 son nativas del continente Americano, y se distribuyen en hábitats muy diversos en cuanto a condiciones climáticas y ubicación geográfica (Escobedo-

López et al., 2012). La variabilidad del germoplasma entre las especies de amaranto es tal que poseen números cromosómicos distintos ($2n=32$, $2n=33$ o $2n=34$) (Palomino et al, 2012). Esto coloca al amaranto como un sistema prometedor para la búsqueda de genes de interés agrobiotecnológico, que permitan el mejoramiento de cultivos a nivel nutricional y en lo referente a sus capacidades para desarrollarse en ambientes adversos. Existen estudios filogenéticos enfocados a describir la historia evolutiva de las especies de amaranto y recientemente se publicó el genoma de *A. hypochondriacus*. Estos estudios reflejan el gran interés que se tiene actualmente a nivel mundial por impulsar la producción de en este cultivo (Kietlinski et al., 2014; Sunil et al., 2014). Sin embargo, no existen estudios que evalúen o confirmen la presencia de características diferenciales a nivel de proteínas entre las semillas de distintas especies amaranto. Existe la teoría de que *A. cruentus* es descendiente directo de *A. hybridus* a partir de un evento de domesticación, y que *A. hypochondriacus* fue resultado de una cruce entre *A. powellii* y *A. cruentus*, esto se sustenta a partir de muestreos de semillas de distintas especies de amaranto en diferentes zonas geográficas de la república mexicana, donde se demuestra que existe una correlación entre los lugares donde *A. powellii*, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* convergen (Escobedo-López et al., 2012). Por esta razón, este trabajo ofrece la primera aproximación mediante proteómica comparativa de las semillas maduras de cuatro especies de amaranto, para identificar las proteínas más abundantes y las variaciones presentes entre los perfiles electroforéticos, incorporando al estudio dos especies silvestres *A. hybridus* y *A. powellii*, y dos especies ampliamente cultivadas para consumo humano *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*.

2. Materiales y métodos

2.1 Material biológico

Las semillas de amaranto de especies silvestres (*A. hybridus* y *A. powellii*) y especies domesticadas (*A. cruentus* cv. amaranteca y *A. hypochondriacus* cv. nutrisol) (Figura 1), fueron proporcionadas por el Dr. Eduardo Espitia Rangel del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Para la obtención de harina las semillas fueron congeladas en nitrógeno líquido y procesadas por 2 min en un molino KRUPS GX4100 por 2 min. Las muestras fueron almacenadas en tubos de plástico a -80 °C hasta su uso.

2.2 Extracción de proteína

Las harinas de las cuatro especies de amaranto fueron desgrasadas con hexano en relación 1:10 (p/v). La mezcla se homogenizó empleando agitación por vórtex a máxima velocidad a 4 °C durante 15 min, posteriormente la mezcla fue centrifugada a 15,000xg por 30 min, a 4 °C en una centrífuga Beckman Avanti J-26S XPI (Berea, California, EUA). El sobrenadante fue descartado y el precipitado secado por aireación en campana de extracción. Las proteínas de naturaleza polar, proteínas solubles, fueron extraídas empleando una solución de Tris 0.1 M, pH 8.5, conteniendo glicerol 10% (v/v) y PMSF 2 mM. La extracción se realizó en relación 1:10 (p/v) mezclando con vórtex a velocidad máxima por 15 min a 4 °C. La proteína soluble se obtuvo por centrifugación (15,000 g, 4 °C, 30 min). El residuo fue suspendido en la misma solución en relación 1:5 (p/v), y se procedió de la forma antes mencionada. Este último paso fue repetido nuevamente. Los tres extractos obtenidos se mezclaron para constituir una sola muestra a la que se

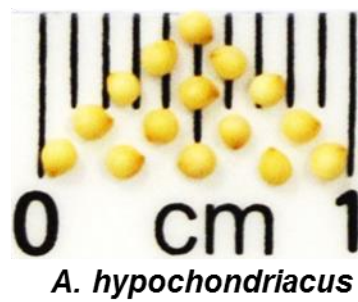
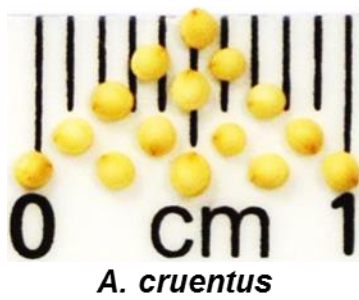
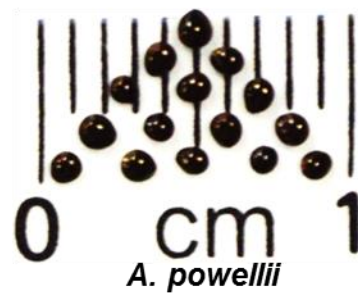
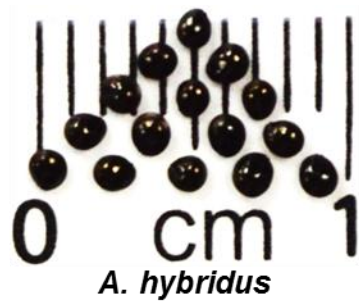


Figura 1. Semillas de las cuatro especies de amaranto

Cada semilla cultivable es de un tamaño similar al de su posible ancestro. Las semillas de *A. hybridus* y *A. cruentus* son de mayor tamaño que las semillas de *A. powellii* y *A. hypochondriacus*.

denominó fracción hidrofílica. Para la extracción de las proteínas de naturaleza apolar, proteínas asociadas a membrana y pared celular (proteínas hidrofóbicas), el residuo resultante del proceso de extracción de la fracción hidrofílica fue tratado con una solución constituida de urea 7 M, tiourea 2 M, 3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-propanosulfonato (CHAPS) 2% (p/v), Triton X-100 2% (v/v)] de la forma mencionada anteriormente para la obtención de la fracción hidrofílica, por lo que también se obtuvieron tres extractos de esta fracción, a los cuales una vez mezclados se les llamó fracción hidrofóbica, para cada muestra se realizaron tres replicas biológicas. La concentración de proteína de los extractos se determinó usando el reactivo Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), el cual se basa en el método de Bradford y empleando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Posterior a las determinaciones se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando una prueba de Holm-Sidak con el módulo de análisis del software SigmaPlot v12.3 (Systat Software, Inc., San José, California, EUA) para análisis pareado y considerando una $p < 0.05$ para diferencias estadísticamente significativas.

2.3 Separación electroforética de las proteínas de amaranto

Los extractos de proteína de las fracciones hidrofílica e hidrofóbica de las semillas de las cuatro especies de amaranto, fueron analizados mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en un sistema discontinuo Tris-Glicinia de acuerdo al método de Laemmli (1970), empleando una concentración de acrilamida del 4% para el gel concentrador y una concentración de acrilamida del 13.5% para gel separador. Para minigeles se aplicaron 10 μ g de

proteína de cada muestra, y fueron se paradas en una cámara Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad) a 100 V por 100 min. Para geles preparativos se utilizó una cámara SE 600 Ruby (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido), se aplicaron 50 µg de proteína de cada muestra y fueron separadas a 10 mA/gel por 1 h, seguido de 25 mA/gel durante 4 h. Concluida la electroforesis, los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie R-250 (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) [azul de Coomassie 0.05% (p/v), metanol 40% (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v), agua destilada 50% (v/v)], y después fueron colocados en solución de desteñido [ácido acético glacial: metanol: agua, 10:40:50 (v/v/v)] hasta observar la presencia de bandas y el fondo claro.

2.4 Aislamiento y tinción de glicoproteínas

El aislamiento de glicoproteínas se realizó mediante un enfoque de cromatografía de afinidad a lectinas en paralelo (Ruiz-May et al., 2012). Para esto se utilizó el Glycoprotein Isolation Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) que contiene concanavalina A (ConA) que reconoce manosa y en menor medida glucosa, y aglutinina de germen de trigo (WGA) que reconoce N-acetil glucosamina y ácido siálico. Cada una de las fracciones hidrofílica e hidrofóbica de las cuatro especies de amaranto fue probada contra ambas lectinas. A una columna con 200 µL de resina de ConA o WGA se aplicó 1 mg de proteína de cada una de las muestras, y se procedió de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las glicoproteínas obtenidas fueron analizadas mediante SDS-PAGE de la forma mencionada anteriormente para minigeles. Después de la separación electroforética, los geles fueron sometidos a tinción de glicoproteínas con el Pierce Glycoprotein Staining

Kit (Thermo Scientific), basado en el método del ácido peryódico-Schiff (PAS, Periodic acid Schiff), mediante el cual los grupos hidroxilo de los residuos de carbohidratos presentes en las glicoproteínas, son oxidados a aldehídos por efecto del ácido peryódico y se tiñen al formar una base de Schiff, produciendo bandas color magenta (Packer et al., 2002). Como controles positivo y negativo se emplearon 10 µg de peroxidasa de rábano (40 kDa) e inhibidor de tripsina de soya (21.5 kDa), respectivamente. Una vez detectadas las bandas de glicoproteínas, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 de la forma mencionada en el apartado 2.3.

2.5 Digestión en gel y análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

Las bandas diferenciales acumuladas observadas en los perfiles electroforéticos de las fracciones hidrofílica e hidrofóbica de las cuatro especies de amaranto, y las bandas de glicoproteínas detectadas fueron cortadas manualmente, desteñidas y reducidas con DTT 10 mM en bicarbonato de amonio 25 mM, seguido de alquilación con iodoacetamida 55 mM. La digestión de proteínas se realizó durante toda la noche a 37 °C con tripsina grado secuenciación (Promega, Madison, WI, EUA). Los péptidos obtenidos fueron separados en un nanoACQUITY UPLC System (Waters, Milford, MA, EUA) equipado con una precolumna Symmetry C18 (5 µm, 20 mm × 180 µm, Waters) y separados en una columna analítica BEH130 C18 (1.7 µm, 100 mm × 100 µm, Waters). Los péptidos se eluyeron de la columna analítica mediante un gradiente lineal (3-50%) de fase móvil B (acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) durante 30 min a un flujo de 600 nL/min, seguido de un lavado durante 3 min con 85% de fase móvil B. La columna se re-equilibró durante

15 min con fase móvil A (agua con 0.1% de ácido fórmico). El análisis de MS se realizó en un equipo SYNAPT HDMS Q-TOF (Waters, Wilmslow, Reino Unido) en el Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN) del IPICYT. El sistema fue operado en modo V y los análisis se realizaron en modo positivo. El compuesto utilizado para la corrección de masas, [Glu1]-Fibrinopeptide B (Sigma-Aldrich) fue aplicado cada 30 s mediante la interfase Nano-Lock-Spray del sistema a un flujo de 200 nL/min y a una concentración de 100 fmol/mL. La radio frecuencia aplicada al cuadrupolo se ajustó de tal manera que solo se transmitieran los iones con un rango de m/z de 50-2000. Los datos de masas exactas fueron colectados en un modo alternado DDA (Data Dependent Acquisition). Los datos de los iones precursores fueron colectados a una energía de colisión constante de 3 eV en modo de baja de energía, para generar iones fragmento se estableció una rampa de voltaje (15 a 45 eV) durante 8 s de integración.

2.6 Identificación de proteínas

Los datos generados mediante espectrometría de masas fueron contrastados contra el subconjunto *Viridiplantae* (3 045 315 secuencias) de la base de datos de proteínas NCBI nr con el motor de búsqueda MASCOT v2.5.1 (Matrix Science, London, Reino Unido). Los parámetros de búsqueda establecidos fueron los siguientes: tripsina como proteasa específica, permitiendo la omisión de un sitio de corte; la tolerancia de masa para los iones de los péptidos precursores y sus fragmentos fue de 10 ppm y 0.1 Da, respectivamente; carbamidometilación de cisteína como modificación fija y oxidación de metionina como modificación

variable. Las identificaciones fueron consideradas satisfactorias al obtener un valor de $p < 0.05$ en MASCOT, indicando identidad o extensa homología.

2.7 Microscopía electrónica de barrido

Mediante microscopía electrónica de barrido, se capturaron imágenes de cortes transversales de las semillas de las cuatro especies de amaranto, con un equipo ESEM modelo Quanta 200 (FEI, Hillsboro, OR, EUA) del Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN), IPICYT.

2.8 Electroforesis 2D

El isoelectroenfoque se realizó en tiras con un gradiente lineal de pH inmovilizado en rangos de 3-10 (24 cm) y 4-7 (7 cm) (GE Healthcare), rehidratadas con 1.2 y 0.3 mg de proteína, respectivamente, de la fracción hidrofílica de las cuatro especies de amaranto. La primera dimensión se llevó a cabo en un equipo Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) empleando el siguiente método: Paso 1, Gradiente a 500 V hasta 10 Vh; Paso 2, Gradiente a 4000 V hasta 5600 Vh; Paso 3, Step and Hold a 8000 V hasta 60000 Vh. Una vez finalizado el isoelectroenfoque, las tiras fueron incubadas en solución de equilibrio (urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, Tris-HCl 50 mM pH 8.8, DTT 1%) por 15 min y aplicadas a SDS-PAGE en geles con una concentración de acrilamida del 13.5 %. Para las tiras de 24 cm se utilizó una cámara Ettan Daltsix (GE Healthcare), las proteínas fueron separadas a una corriente constante de 10 mA/gel durante 27 h. Para las tiras de 7 cm se empleó una cámara Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad), las proteínas fueron separadas a 100 V por 100 min. Concluida la electroforesis, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 de la forma mencionada en el apartado 2.3.

3. Resultados y discusión

3.1 Extracción y cuantificación de proteína

El valor nutricional de los pseudocereales está relacionado principalmente con su contenido de proteína, ya que estas biomacromoléculas están involucradas en una gran diversidad de funciones fisiológicas (Gorinstein et al., 2002). Con la finalidad de lograr una mayor cobertura en la obtención de las proteínas presentes en el grano de amaranto, se empleó un enfoque de fraccionamiento secuencial basado en solubilidad, mediante el cual se extrajeron primero las proteínas de naturaleza polar o hidrofílicas, seguido de la obtención de las proteínas de naturaleza apolar o hidrofóbicas (Komatsu y Ahsan, 2009; Silva-Sánchez et al., 2013).

Para la fracción hidrofílica, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el contenido de proteína de *A. hybridus* (43.27 mg/g) con el de *A. powellii* (42.53 mg/g) (Figura 2, Tabla Suplementaria S1). *A. cruentus* presentó un contenido de proteína significativamente mayor (46.27 mg/g) que el de *A. powellii* en esta fracción. La especie con mayor contenido de proteína en fracción hidrofílica fue *A. hypochondriacus* con 49.7 mg/g (Figura 2). En la fracción hidrofóbica, la especie con menor contenido de proteína fue *A. cruentus* (49.67 mg/g), y la especie con mayor contenido de proteína fue *A. powellii* (89.07 mg/g). No se encontró diferencia estadísticamente significativa en el contenido de proteína de la fracción hidrofóbica entre *A. hybridus* y *A. hypochondriacus* (Figura 2, Tabla Suplementaria S1). El alto contenido de proteína en la fracción hidrofóbica, hace de *A. powellii* la especie con mayor contenido de proteína total (131.60 mg/g), seguido de *A. hypochondriacus* (111.67 mg/g), *A. hybridus* (109.87 mg/g) y finalmente *A. cruentus* (95.93 mg/g). Se ha reportado recientemente que

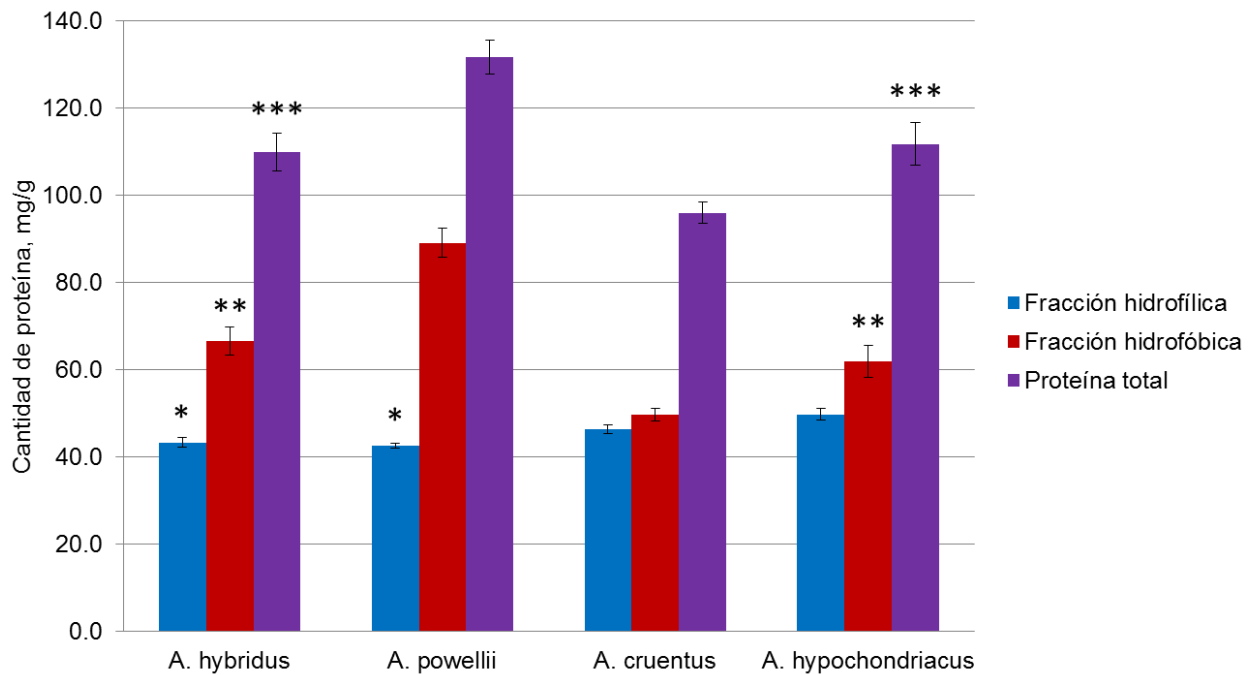


Figura 2. Contenido de proteína de las semillas de las cuatro especies de amaranto determinado por el método de Bradford.

A. hypochondriacus es la especie con mayor contenido de proteína en la fracción hidrofílica, sin embargo, *A. powellii* es la especie con mayor contenido de proteína en la fracción hidrofóbica, lo que la posiciona como la especie con el mayor contenido de proteína total. Las barras de error indican \pm SD de tres replicas biológicas. *, **, ***; No existe diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

los granos de las especies silvestres de arroz (género *Oryza*), presentan un contenido de proteína mayor que las especies domesticadas (Jiang et al., 2014). Las diferencias en el contenido de proteína total entre las especies silvestres y domesticadas de arroz, se deben a la elevada proporción que representa la fracción glutelinas, la cual está conformada principalmente por proteínas de reserva que se caracterizan por su baja solubilidad en condiciones de pH neutro y fuerza iónica moderada, por lo que solo pueden ser extraídas mediante ácidos o álcalis diluidos, o en condiciones desnaturalizantes empleando detergentes (Miernyk y Hajduch, 2011; Jiang et al., 2014). Esto concuerda con el resultado obtenido en este trabajo, donde las proteínas de la fracción hidrofóbica hacen del ejemplar silvestre *A. powellii*, la especie con mayor contenido de proteína total. Con base en esto, se puede sugerir a *A. powellii* como una opción interesante para generar variedades de amaranto con mayor contenido de proteína en su grano.

3.2 Electroforesis comparativa de las proteínas de las cuatro especies de amaranto

El patrón electroforético obtenido de la fracción hidrofílica de las cuatro especies de amaranto, muestra bandas en todo el rango de separación, por debajo de 10 kDa hasta por arriba de 220 kDa (Figura 3A). Las bandas más intensas en esta fracción se observan a bajo peso molecular y en una banda entre 30 y 40 kDa. Por el contrario, la fracción hidrofóbica muestra un número menor de bandas, que están representadas principalmente por tres grupos cercanos a 20, 30 y 50-70 kDa (Figura 3B). En ambas fracciones pueden observarse diferencias evidentes en cuanto a intensidad y a presencia/ausencia de bandas entre las cuatro especies,

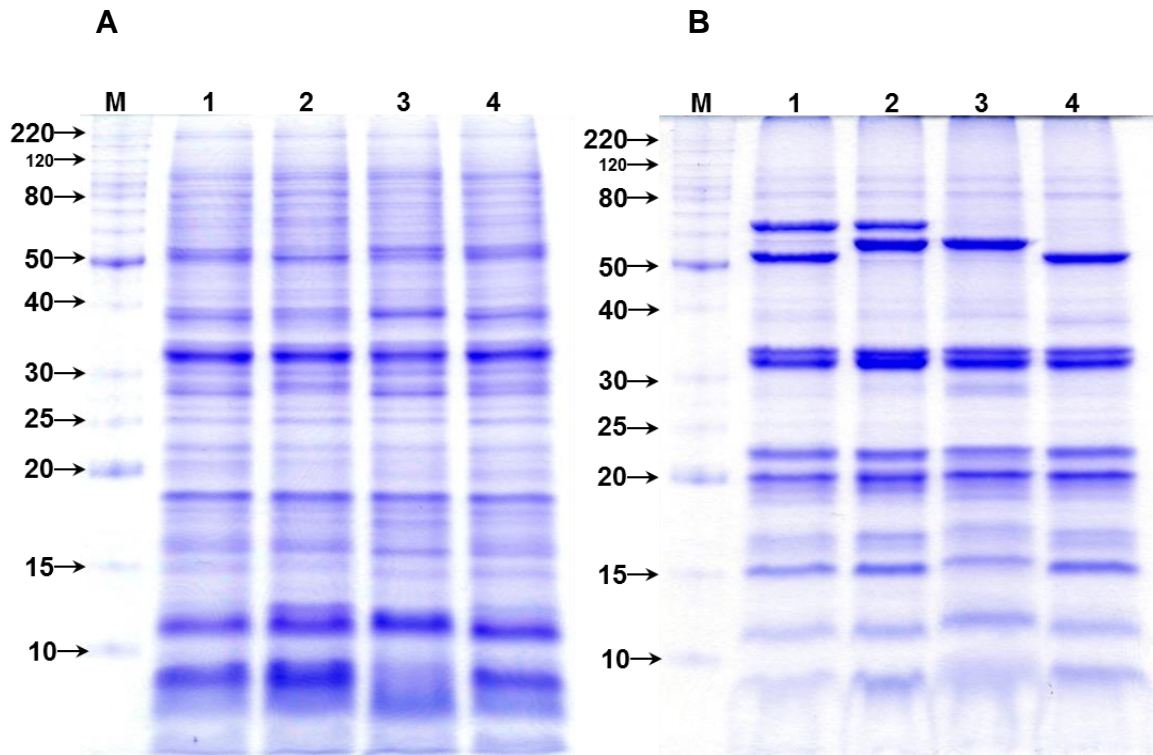


Figura 3. Perfil electroforético comparativo de las fracciones hidrofílica e hidrofóbica de las cuatro especies de amaranto.

Las diferencias entre las especies son muy notorias en cuanto a intensidad y a presencia/ausencia de bandas a lo largo de todo el rango de peso molecular en ambas fracciones. **A**, Fracción hidrofílica; **B**, Fracción hidrofóbica. Carriles: **M**, Marcador de peso molecular (kDa); **1**, *A. hybridus*; **2**, *A. powellii*; **3**, *A. cruentus*; **4**, *A. hypochondriacus*. Se aplicaron 10 µg de proteína por carril.

por lo que se procedió a resolver los extractos en un formato electroforético de mayor tamaño, asignando un número de identificación a cada una de las bandas diferenciales y de mayor abundancia (Figura 4), las cuales fueron cortadas manualmente y analizadas por LC-MS/MS.

3.3 Identificación de proteínas

3.3.1 Proteínas identificadas en la fracción hidrofílica

3.3.1.1 Estructura y mecánica celular

En la banda 1, con mayor abundancia en *A. hybridus*, se identificó una clatrina (Figura 4, Tabla 1, Tabla Suplementaria S2). Esta proteína regula la endocitosis, es responsable de la internalización celular de nutrientes, patógenos, antígenos, factores de crecimiento y receptores, y tiene la capacidad de reensamblarse *in vitro* para formar estructuras semejantes a las cápsides de virus. Las plantas con una funcionalidad deficiente de clatrina presentan defectos en la endocitosis, lo que ocasiona alteración de los patrones de acumulación de auxinas, y como consecuencia, deformaciones morfológicas durante el desarrollo embrionario, alteraciones del crecimiento gravitrófico y desarrollo de raíces laterales (Le Roy y Wrana, 2005; Kitakura et al., 2011; Kirchhausen et al., 2014).

3.3.1.2 Respuesta a estrés oxidante

En el metabolismo aeróbico, constantemente se producen especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species) como oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y radical hidroxilo (OH^{\cdot}) a niveles basales, incapaces de producir daño al ser neutralizadas mediante distintos mecanismos antioxidantes. Sin embargo, este equilibrio puede romperse a causa

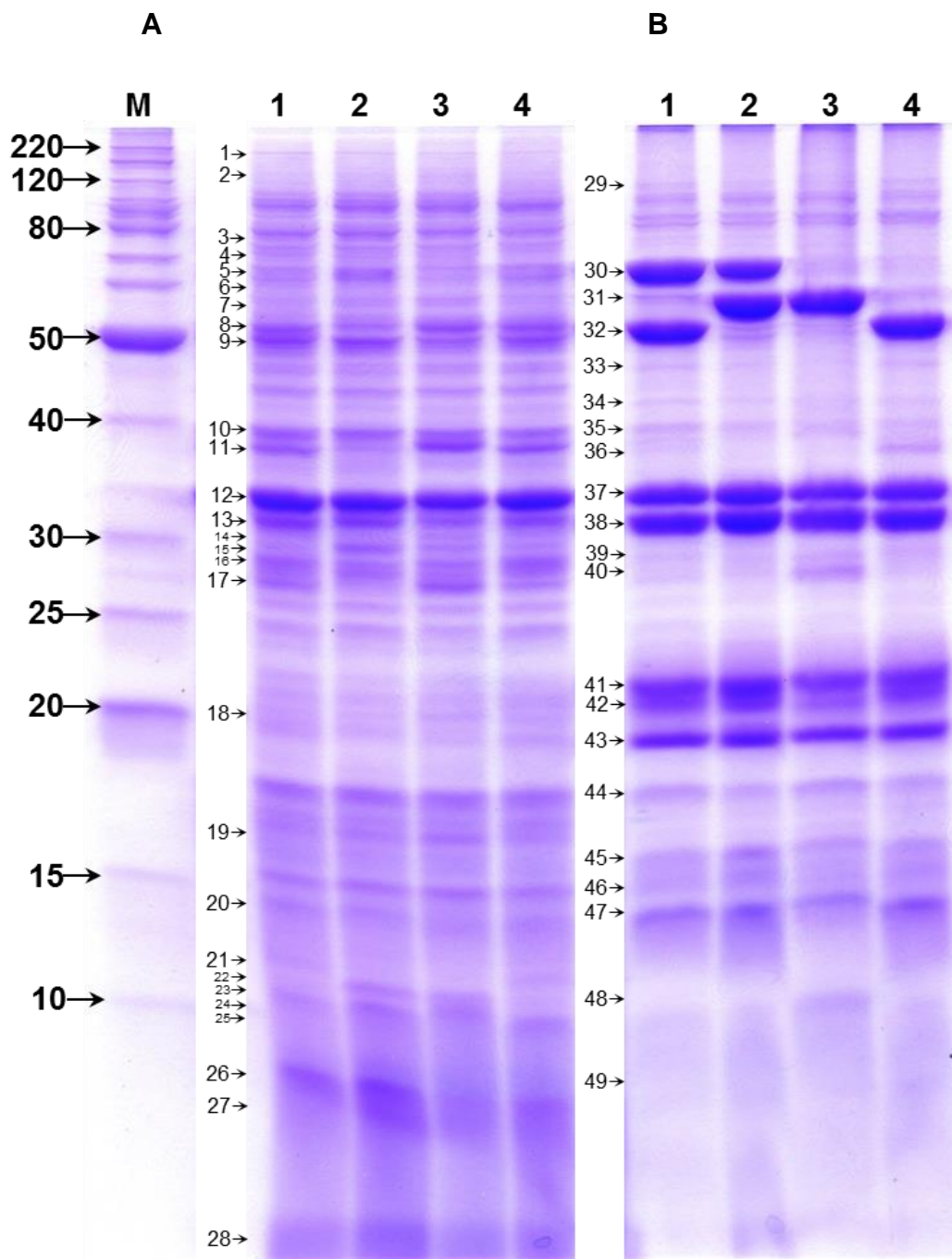


Figura 4. Resolución de los extractos proteínicos de las semillas de las cuatro especies de amaranto en un formato electroforético de mayor tamaño. A la izquierda de cada una de las bandas analizadas se encuentra el número de identificación asignado indicado por una flecha. **A**, Fracción hidrofílica; **B**, Fracción hidrofóbica. Carriles: **M**, Marcador de peso molecular (kDa); **1**, *A. hybridus*; **2**, *A. powellii*; **3**, *A. cruentus*; **4**, *A. hypochondriacus*. Se aplicaron 50 μ g de proteína por carril.

Tabla 1. Proteínas identificadas con relación a estructura y mecánica celular

No Banda¹	Proteína Identificada	Organismo	Número de acceso²
1 A. hyb	Clathrin, heavy chain	<i>A. thaliana</i>	gi 30681617

¹ Numero de banda correspondiente al indicado en la Figura 4 y especie de amaranto correspondiente; **A. hyb**, *A. hybridus*; **A. pow**, *A. powellii*; **A. cru**, *A. cruentus*; **A. hyp**, *A. hypochondriacus*.² Numero de acceso de acuerdo a NCBI.

de distintos tipos de estrés como salinidad, sequía, temperaturas extremas, metales pesados, contaminación, radiación elevada y organismos patógenos. La exposición a estas condiciones puede incrementar los niveles de ROS en la célula, las cuales ocasionan daños severos a proteínas, lípidos y DNA, afectando las funciones celulares y provocando la disminución en el rendimiento de cultivos.

Para contrarrestar la sobreproducción de ROS las plantas poseen un arsenal enzimático constituido por superóxido dismutasas (SOD), ascorbato peroxidasas (APX), guayacol peroxidasas (GPX), glutatión-S-transferasas (GST), catalasas (CAT), tiorredoxinas (TRX) y glutatión reductasas (GR) (Apel y Hirt, 2004; Das y Roychoudhury, 2014).

En las semillas de amaranto fueron identificadas tres de estas proteínas de respuesta a estrés oxidante. La primera de ellas correspondió a una CAT, en las bandas 1 y 7 (Figura 4, Tabla 2, Tabla Suplementaria S2), la banda 1 es más abundante en *A. hybridus*, mientras que la banda 7 es más abundante en *A. cruentus*. El peso molecular experimental de la CAT en la banda 7 es de 56.7 kDa, valor muy cercano al reportado para una CAT de *Arabidopsis thaliana* que se acumula durante la germinación (Gallardo et al., 2001). La CAT de la banda 1 presenta un peso molecular experimental inusual de 193.3 kDa, poco común para estas proteínas, cuyos monómeros varían entre 50 y 70 kDa (Switala y Loewen, 2002; Mhamdi et al., 2010), sin embargo, al realizar un BLASTP de los péptidos obtenidos de la identificación de esta CAT, contra la base de datos de proteínas NCBI nr y restringiendo la búsqueda al subconjunto *Viridiplantae* (datos no mostrados), el resultado indica que efectivamente se trata de una CAT. Esto

Tabla 2. Proteínas identificadas con relación a respuesta a estrés oxidante

No Banda ¹	Proteína Identificada	Organismo	Número de acceso ²
1 A. hyb	Catalase	<i>Beta vulgaris</i>	gi 731361773
7 A. cru	Catalase	<i>Beta vulgaris</i>	gi 731361773
	Glutathione reductase precursor	<i>Spinacia oleracea</i>	gi 529375
22 A. hyp	Thioredoxin	<i>Capsicum annuum</i>	gi 40287476

¹ Numero de banda correspondiente al indicado en la Figura 4 y especie de amaranto correspondiente; **A. hyb**, *A. hybridus*; **A. pow**, *A. powellii*; **A. cru**, *A. cruentus*; **A. hyp**, *A. hypochondriacus*.² Numero de acceso de acuerdo a NCBI.

sugiere que las semillas de amaranto poseen al menos dos parálogos de catalasa. Otra enzima de respuesta estrés oxidante identificada en la banda 7, la cual es más intensa en *A. cruentus*, fue una GR. GR es la enzima principal del ciclo ascorbato-glutatión pues media la conversión de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH). Se han caracterizado GR's citosólicas, cloroplásticas y mitocondriales en diversas especies de plantas como *Nicotiana tabacum*, *Spinacia oleracea*, *Pinus strobus*, *Vigna unguiculata*, *Pisum sativum*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Glycine max*, *A. thaliana*, *Oryza sativa*, *Brassica campestris*, *Triticum aestivum* y *Pennisetum glaucum* (Achary et al., 2015). La sobreexpresión de una GR de 53 kDa de *Pennisetum glaucum* en *Escherichia coli*, incrementa la tolerancia de esta bacteria ante estrés oxidante inducido por metales pesados, mientras que la delección de la GR3 de *O. sativa* incrementa considerablemente la sensibilidad de la planta ante estrés salino (Achary et al., 2015; Wu et al., 2015). La tercera enzima relacionada con resistencia a estrés oxidante fue identificada en la banda 22, presente únicamente en *A. hypochondriacus*, y corresponde a una TRX, una proteína ubicua de bajo peso molecular, que desempeña un papel indispensable en la regulación redox de los grupos tiol de las cisteínas de ciertas proteínas blanco, altamente sensibles a la oxidación por efecto de ROS, por ejemplo, mantienen el estado redox necesario para que ciertos factores de transcripción puedan unirse a su promotor respectivo (Sevilla et al., 2015; Yoshida et al., 2015). Además, evidencias recientes sugieren que las TRX están implicadas en la regulación de procesos metabólicos de suma importancia, como el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, al modular la actividad de las enzimas fumarasa y succinato deshidrogenasa (Daloso et al., 2015).

3.3.1.3 Respuesta a estrés térmico

Las proteínas de respuesta a choque térmico (HSP's, Heat Shock Proteins), o chaperonas moleculares, son sintetizadas cuando las plantas son expuestas a altas temperaturas e intervienen durante el ensamble de complejos, plegamiento y transporte de proteínas a organelos celulares, en el control de la señalización del ciclo celular, así como en la protección de la célula ante distintos tipos de estrés. Las HSP's más estudiadas presentan pesos moleculares de 100, 90, 70, 60 y 12-40 kDa, y se denominan familias HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y sHSP's (Small Heat Shock Proteins), respectivamente (Timperio et al., 2008; Usman et al., 2014).

En este trabajo se encontraron tres HSP's presentes en las semillas de amaranto. La primera con un peso molecular experimental de 135.2 kDa, identificada como chaperona ClpB1 perteneciente a la familia HSP100, con mayor intensidad en *A. powellii* (Banda 2 Figura 4, Tabla 3, Tabla Suplementaria S2) (Nieto-Sotelo et al., 1999). Esta familia de HSP's sobresale por su capacidad de reactivar proteínas agregadas o mal plegadas, resolubilización de agregados proteínicos no funcionales y contribuye con la degradación de polipéptidos que han sufrido un daño irreversible (Usman et al., 2014). Además de *Z. mays*, las HSP100 han sido estudiadas en distintas especies como *A. taliana*, *O. sativa* y *T. aestivum* (Agarwal et al., 2001; Campbell et al., 2001; Batra et al., 2007). El hecho de que las HSP100 son cruciales para la termotolerancia de plantas sugiere que, mediante la sobreacumulación de estas proteínas puedan obtenerse cultivares con capacidad de resistencia a periodos prolongados de estrés (Usman et al., 2014). La familia HSP70 está presente en prácticamente todas las plantas, con proteínas

Tabla 3. Proteínas identificadas con relación a respuesta a estrés térmico

No Banda¹	Proteína Identificada	Organismo	Número de acceso²
2 A. pow	Chaperone protein ClpB1-like isoform X1	<i>Citrus sinensis</i>	gi 568847666
4 A. hyb	Heat shock 70 protein	<i>Spinacia oleracea</i>	gi 2654210
4 A. pow	Heat shock 70 protein	<i>Spinacia oleracea</i>	gi 2654210
19 A. cru	Small heat shock protein	<i>Musa acuminata</i>	gi 376341420

¹ Numero de banda correspondiente al indicado en la Figura 4 y especie de amaranto correspondiente; **A. hyb**, *A. hybridus*; **A. pow**, *A. powellii*; **A. cru**, *A. cruentus*; **A. hyp**, *A. hypochondriacus*.² Numero de acceso de acuerdo a NCBI.

homólogas organelo específicas en citoplasma, mitocondria, cloroplasto y retículo endoplásmico. Su principal función es estabilizar proteínas a medida que son liberadas por los ribosomas, para prevenir que los polipéptidos recién sintetizados sufran pérdida de plegamiento o formen agregados incluso antes de finalizar su síntesis (Fink, 1999). También intervienen en la modulación de transductores de señales como cinasas y fosfatasas, por lo que podrían tener un campo de acción muy amplio al participar en la regulación de diversos genes durante estrés, e incluso, en condiciones normales (Vigh et al., 2007; Richter et al., 2010). La banda en la que se identificó esta proteína (Banda 4 Figura 4, Tabla 3, Tabla Suplementaria S2) es más abundante en las especies silvestres de amaranto que en las especies domesticadas, lo que sugiere que las especies silvestres sintetizan niveles basales más elevados de esta proteína que sus descendientes y por lo tanto, están más preparadas para contrarrestar el daño causado por estrés, ya sea mediante el desempeño directo de HSP70 como chaperona molecular, o mediante su intervención en mecanismos de regulación de rutas de transducción de señales. Sin embargo, la proteína detectada como sHSP en la banda 19 (Figura 4, Tabla 3, Tabla Suplementaria S2), es notablemente más abundante en *A. cruentus*. Las plantas sintetizan cantidades significativas de sHSP's al ser expuestas a altas temperaturas, sequia, estrés oxidativo, frío o salinidad. La diversidad funcional de las sHSP's se ve reflejada en que cada una posee una secuencia única y su abundancia es inusual en plantas. A pesar de que no pueden replegar proteínas no nativas, pueden unirse a aquéllas parcialmente plegadas o desnaturalizadas, para prevenir un despliegue irreversible o agregación, y facilitar la acción de HSP70 y HSP100 (Mogk et al., 2003; Nakamoto y Vigh., 2007). Esta

variabilidad de HSP's entre las especies de las semillas de amaranto sugiere que cada especie ha desarrollado un perfil distinto de respuesta a estrés abiótico en función de sus condiciones de cultivo y desarrollo.

3.3.1.3 LEA

Las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) se acumulan durante el último periodo del desarrollo de semillas, caracterizado por desecación. En semillas su principal desempeño se enfoca a otorgar tolerancia a la desecación, mientras que en una planta completa están involucradas con la resistencia a estrés salino, frío y sequía. Son proteínas pequeñas con pesos moleculares de 10 a 30 kDa y han sido estudiadas en diversas especies de plantas, y clasificadas en siete grupos con base en similitud de sus secuencias de aminoácidos y en la presencia de motivos conservados distintivos (Hong-Bo et al., 2005; Battaglia y Covarrubias, 2013). Se ha observado que la sobreexpresión de genes que codifican para proteínas LEA incrementa la tolerancia a distintos tipos de estrés abiótico en diversas plantas como sequía en arroz y trigo, frío en tabaco y congelamiento en fresa y *A. thaliana* (Hundertmark y Dirk, 2008).

En este trabajo se identificaron dos proteínas LEA en *A. hybridus*, con pesos moleculares experimentales de 65.9 y 11.2 kDa (Bandas 4 y 21, Figura 4, Tabla 4, Tabla Suplementaria S2). Previamente se reportó la presencia de tres proteínas LEA en las semillas de *A. cruentus* (Maldonado-Cervantes et al., 2014), una de ellas, con peso molecular experimental de 53.3 kDa, y al igual que la LEA de 65.9 kDa aquí reportada para *A. hybridus*, el ortólogo identificado fue una LEA del grupo 3 de *Brassica napus* (gij213053669), por lo que probablemente se trate del ortólogo correspondiente entre ambas especies. En *A. powelli*, *A. cruentus* y *A.*

Tabla 4. Proteínas LEA identificadas

No Banda¹	Proteína Identificada	Organismo	Número de acceso²
4 A. hyb	LEA protein group 3	<i>Brassica napus</i>	gi 213053669
21 A. hyb	Late embryogenesis-abundant protein	<i>Glycine max</i>	gi 1762955
24 A. pow	Late embryogenesis-abundant protein	<i>Glycine max</i>	gi 1762955
24 A. cru	Late embryogenesis-abundant protein	<i>Glycine max</i>	gi 1762955
25 A. hyp	Late embryogenesis-abundant protein	<i>Glycine max</i>	gi 1762955
27 A.pow	Late embryogenesis-abundant protein	<i>Glycine max</i>	gi 1762955

¹ Numero de banda correspondiente al indicado en la Figura 4 y especie de amaranto correspondiente; **A. hyb**, *A. hybridus*; **A. pow**, *A. powellii*; **A. cru**, *A. cruentus*; **A. hyp**, *A. hypochondriacus*.² Numero de acceso de acuerdo a NCBI. **LEA** (Late Embryogenesis Abundant Protein)

hypochondriacus se identificó una LEA con peso molecular experimental de 10, 9.9 y 9.7 kDa, respectivamente (Bandas 24 y 25 Figura 4, Tabla 4, Tabla Suplementaria S2). La LEA de 11.2 kDa de *A. hybridus* fue identificada como el mismo ortólogo de LEA de *G. max* (gi|1762955) que en *A. powellii*, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*, y en las cuatro especies está presente el péptido K.SLEAQQHLAEGR.S. En este caso también podría tratarse de la proteína ortóloga equivalente entre las tres especies, sin embargo, es posible que exista una diferencia considerable entre las secuencias de estas proteínas, sugerida por la diferencia observada del peso molecular experimental, y posiblemente posean propiedades distintas de protección ante estrés abiótico.

3.3.2 Proteínas identificadas en la fracción hidrofóbica

3.3.2.1 Sintetas de almidón acopladas a granulo

Las proteínas diferenciales más evidentes de la fracción hidrofóbica de las cuatro especies de amaranto se observan entre 50 y 70 kDa (Figuras 3 y 4). En las bandas 30, 31 y 32 fueron identificadas sintetas de almidón acopladas a granulo (GBSS, Granule-bound starch synthase) (Tabla 5, Tabla Suplementaria S3), las cuales se encargan de la síntesis de amilosa (Ortega et al., 2014; Guzmán et al., 2015; Nakamura, 2015). La banda 30 solo está presente en las especies silvestres, la banda 31 es compartida entre *A. powellii* y *A. cruentus*, aunque también se encuentra en *A. hybridus* pero en mucha menor proporción, y la banda 32 está presente en las cuatro especies, pero sobresale entre *A. hybridus* y *A. hypochondriacus*. Estos resultados indican que cada una de las especies de amaranto presenta una maquinaria enzimática distinta para la síntesis de almidón, y más aún, el perfil electroforético sugiere que las especies silvestres poseen dos

Tabla 5. Sintetasas de almidón acopladas a gránulo identificadas en las semillas de amaranto

No Banda¹	Proteína Identificada	Organismo	Número de acceso²
30 A. hyb	Granule-bound starch synthase I	<i>Amaranthus cruentus</i>	gi 260268387
30 A. pow	Granule-bound starch synthase I	<i>Amaranthus cruentus</i>	gi 260268387
31 A. hyb	Granule-bound starch synthase I	<i>Amaranthus cruentus</i>	gi 260268387
31 A. pow	Granule-bound starch synthase I	<i>Amaranthus cruentus</i>	gi 260268387
32 A. pow	Granule-bound starch synthase	<i>Cucurbita moschata</i>	gi 343410565

¹ Numero de banda correspondiente al indicado en la Figura 4 y especie de amaranto correspondiente; **A. hyb**, *A. hybridus*; **A. pow**, *A. powellii*; **A. cru**, *A. cruentus*; **A. hyp**, *A. hypochondriacus*.² Numero de acceso de acuerdo a NCBI.

parálogos o isoformas de GBSS's principales de gran abundancia, mientras que las especies domesticadas solo una.

Mediante la manipulación de la expresión de esta enzima y de su equivalente soluble, encargada de la síntesis de amilopectina, pueden obtenerse cultivos cuyos granos presentan distintas relaciones de amilosa/amilopectina y por lo tanto, almidón con propiedades fisicoquímicas distintas (Guzmán et al., 2015; Nakamura, 2015). La delección de GBSS no altera de forma significativa la cantidad de almidón total, sin embargo las plantas mutantes de arroz, maíz, cebada y trigo, producen granos con un contenido reducido, e incluso, por completo carentes de amilosa (Jeon et al., 2010). El interés por la obtención de cultivos con almidones modificados, se ve reflejado en las recientes publicaciones relacionadas con la búsqueda y manipulación de nuevos genes de sintasas de almidón (Hanashiro et al., 2008; Izumo et al., 2011; Ortega et al., 2014; 2015; Guzmán et al., 2015). Se ha visto que al modificar la actividad de las GBSS, es posible generar variaciones en la morfología de los gránulos de almidón (Fulton et al., 2002; Izumo et al., 2011). Con esto en cuenta, y con la finalidad de indagar si las diferencias observadas en los perfiles electroforéticos entre las especies, representan también variaciones a nivel morfológico de los gránulos de almidón, se realizaron cortes transversales de las semillas de las cuatro especies de amaranto y se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido. En la micrografía de la Figura 5 pueden observarse estructuras poliédricas en el perisperma de las semillas de *A. hybridus* y *A. powellii*, semejantes a las reportadas previamente para gránulos de almidón aislados (Kong et al., 2009; Valcárcel-Yamani y Caetano da Silva Lannes,

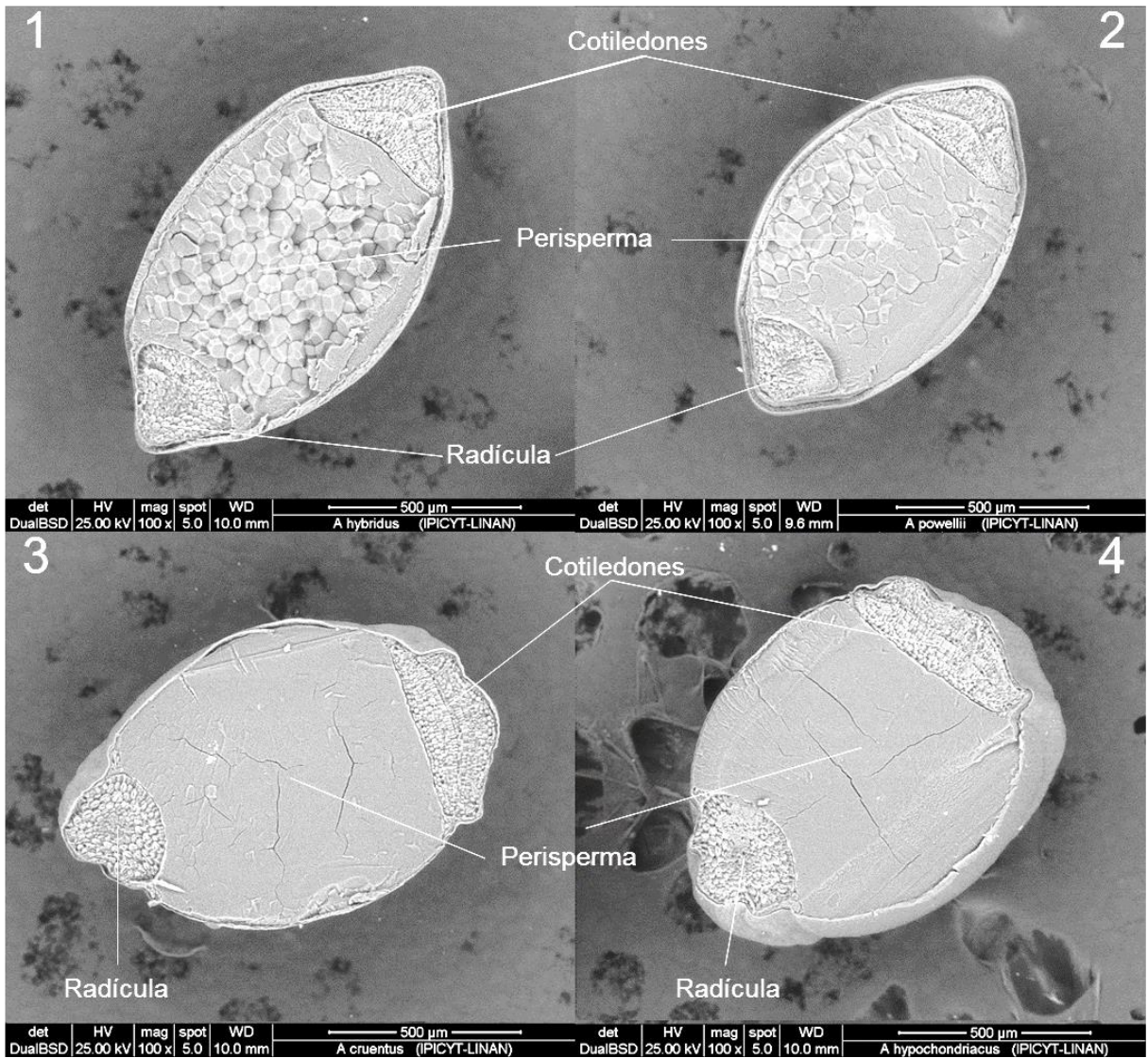


Figura 5. Micrografías tomadas mediante microscopía electrónica de barrido de cortes transversales de las semillas de las cuatro especies de amaranto. Solamente en el perisperma de *A. hybridus* y *A. powellii* se observan estructuras poliédricas características de gránulos de almidón. 1, *A. hybridus*; 2, *A. powellii*; 3, *A. cruentus*; 4, *A. hypochondriacus*.

2012). Estas estructuras no se aprecian en las semillas de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*, lo que habla de una brecha estructural entre los gránulos de almidón de especies silvestres y domesticadas, debida probablemente a la diferencia entre sus GBSS.

3.3.3 Proteínas de reserva

Las proteínas de reserva de semillas (SSP, Seed Storage Proteins) son de particular importancia, pues al estar presentes en altas cantidades impactan considerablemente en la calidad de la proteína, e influyen en las características de varios parámetros nutricionales y fisicoquímico-funcionales, por ejemplo, en semillas de girasol las SSP representan alrededor del 85% de la proteína total (Shewry et al., 1995; González-Pérez y Vereijken, 2007).

Las globulinas 11S o leguminas, son las SSP más abundantes en leguminosas, en soya representan el 40% de la proteína total, y en algunos cereales como avena y arroz constituyen el 70-80% (Shewry y Halford, 2002; Tandang et al., 2005). En *A. hypochondriacus* conforman el 18.6% de las proteínas de la semilla madura (Barba de la Rosa et al. 1992; Osuna- Castro et al., 2000). Los monómeros de las globulinas 11S presentan pesos moleculares de 50-60 kDa, formados a su vez de una subunidad ácida (α , 30-40 kDa) y una básica (β , 20-25 kDa) unidas por un enlace disulfuro, denominadas de tal forma por el valor de sus respectivos puntos isoeléctricos (Tandang-Silvas et al., 2011).

Resulta muy interesante que en un gran número de las bandas analizadas se hayan identificado globulinas 11S. Las bandas 12, 14-17 de la fracción hidrofílica y 38-40 de la fracción hidrofóbica empatan con el peso molecular esperado para la subunidad α de una globulina 11S, al igual que las bandas 18 de la fracción

hidrofílica y 41-45 de la fracción hidrofóbica para la subunidad β . La presencia de múltiples isoformas para una SSP y diferencias en su abundancia, se ha observado previamente en estudios de proteómica comparativa de semillas de especies silvestres y domesticadas de arroz, y entre distintos cultivares de soya, cacahuete y girasol (Hajduch et al., 2007; Natarajan et al., 2007; Kottapalliet al., 2008; Gomeset al. 2014; Jiang et al., 2014)

Propiedades como hidrofobicidad superficial y potencial electrostático, que a su vez afectan características como solubilidad o capacidad para formar emulsiones, están determinadas por el orden y la proporción en que se encuentran los distintos tipos de aminoácidos que constituyen a una proteína, por lo que al modificar la secuencia de aminoácidos es posible incidir en estas características fisicoquímicas (Carrasco-Peña et al., 2013). La heterogeneidad de los perfiles electroforéticos correspondientes a globulinas 11S en las cuatro especies de amaranto, así como la presencia de versiones hidrofílicas e hidrofóbicas de esta proteína, indican la existencia de una gran variabilidad genética, por lo que representan una fuente valiosa de germoplasma para la obtención de SSP con propiedades nutricionales y fisicoquímicas distintas con aplicación potencial en tecnología de alimentos.

Es importante destacar la identificación de globulinas 11S en bandas con pesos moleculares inusualmente bajos para este tipo de proteínas (bandas 21, 22 y 24 fracción hidrofílica y banda 49 fracción hidrofóbica), por lo que podría tratarse de otras proteínas de reserva que comparten secuencias conservadas con la globulina 11S, ya que las SSP son codificadas por familias multigénicas con niveles elevados de polimorfismo (Shewry et al., 1995).

3.3.4 Glicoproteínas

El desarrollo de los mecanismos de glicosilación se considera como la tercera revolución evolutiva, sumamente compleja, ya que a diferencia de los ácidos nucleicos y las proteínas, su síntesis no depende un molde molecular, característica que le permite crear nuevas estructuras sin la necesidad de alterar la información genética existente (Lauc et al., 2014). La mayoría de las proteínas de eucariotas son modificadas postraduccionalmente mediante la incorporación de oligosacáridos complejos. Existen dos formas de glicosilación, O-glicosilación y N-glicosilación. En las O-glicosilaciones, los carbohidratos están unidos al átomo de oxígeno del grupo hidroxilo en la cadena lateral de serina o treonina, y en las N-glicosilaciones, los glicanos se encuentran unidos al átomo de nitrógeno de la cadena lateral de un residuo de asparagina, ubicado en la secuencia consenso N-X-S/T, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina (Song et al., 2011; Lauc et al., 2014). Las N-glicosilaciones son una de las modificaciones postraduccionales más comunes y heterogéneas, están involucradas en el control del plegamiento y estabilidad estructural de proteínas, localización organelo específica de proteínas, unión a ligandos, endocitosis, reconocimiento inmune, señalización y movilidad celular (Song et al., 2013; Ruiz-May et al. 2014).

Al considerar la gran relevancia biológica que representan estas modificaciones postraduccionales, se decidió analizar el glicoproteoma de las semillas de amaranto mediante un enfoque de cromatografía de afinidad a lectinas en paralelo, utilizando ConA y WGA. En las Figuras 6 y 7 puede observarse el perfil electroforético resultante de las glicoproteínas aisladas para las fracciones hidrofílica e hidrofóbica de las cuatro especies de amaranto, respectivamente. Al

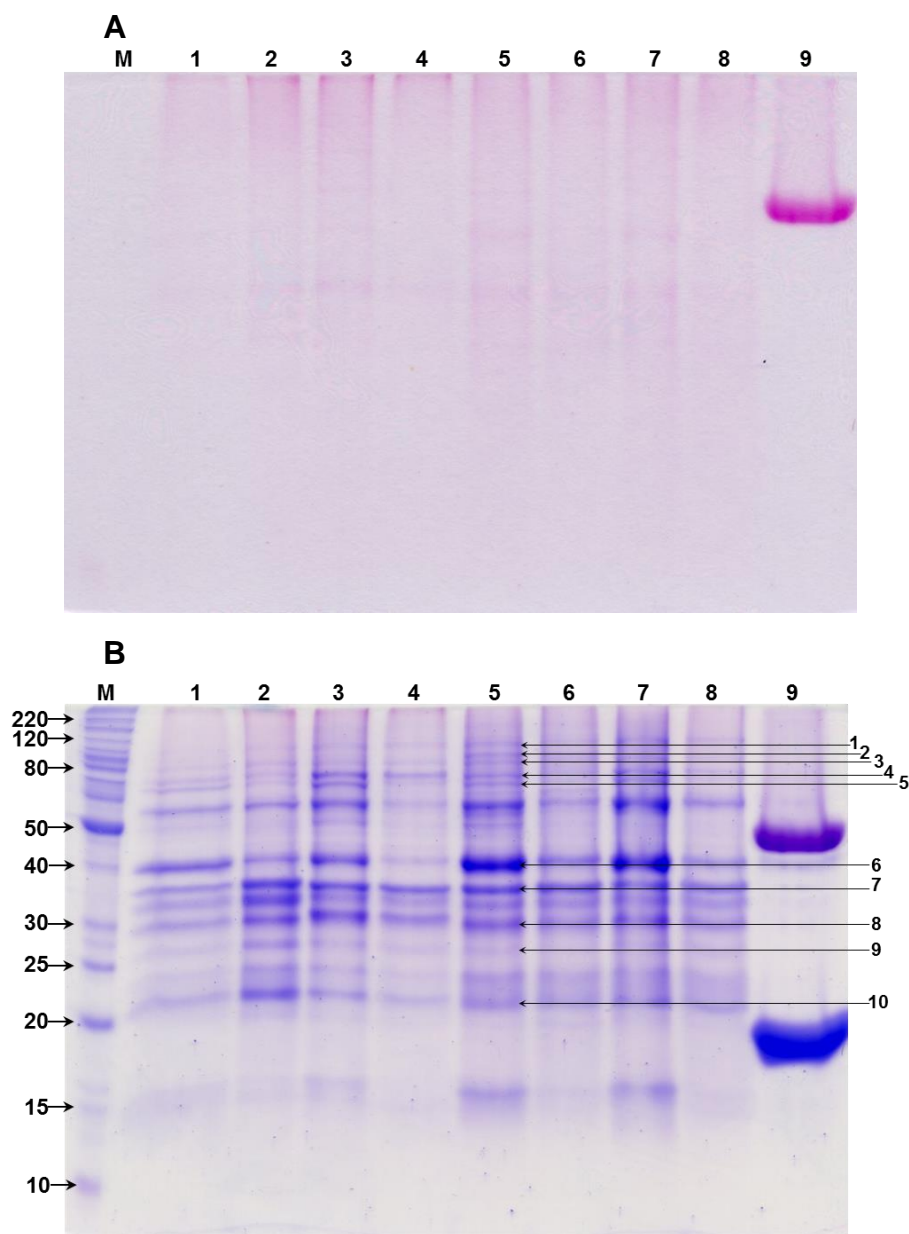


Figura 6. Glicoproteínas aisladas de la fracción hidrofílica de las cuatro especies de amaranto mediante cromatografía de afinidad a lectinas.

Existe redundancia en la afinidad de ConA y WGA por las glicoproteínas de las diferentes especies de amaranto. **A**, Tinción para detección de glicoproteínas; **B**, Tinción con azul de Coomassie R-250. Carriles: M, Marcador de peso molecular (kDa); 1. *A. hybridus* hidrofílica ConA; 2. *A. hybridus* hidrofílica WGA; 3. *A. powellii* hidrofílica ConA; 4. *A. powellii* hidrofílica WGA; 5. *A. cruentus* hidrofílica ConA; 6. *A. cruentus* hidrofílica WGA; 7. *A. hypochondriacus* hidrofílica ConA; 8. *A. hypochondriacus* hidrofílica WGA; 9. Controles. Positivo peroxidasa de rábano (40 kDa); Negativo inhibidor de tripsina de soya (21.5 kDa).

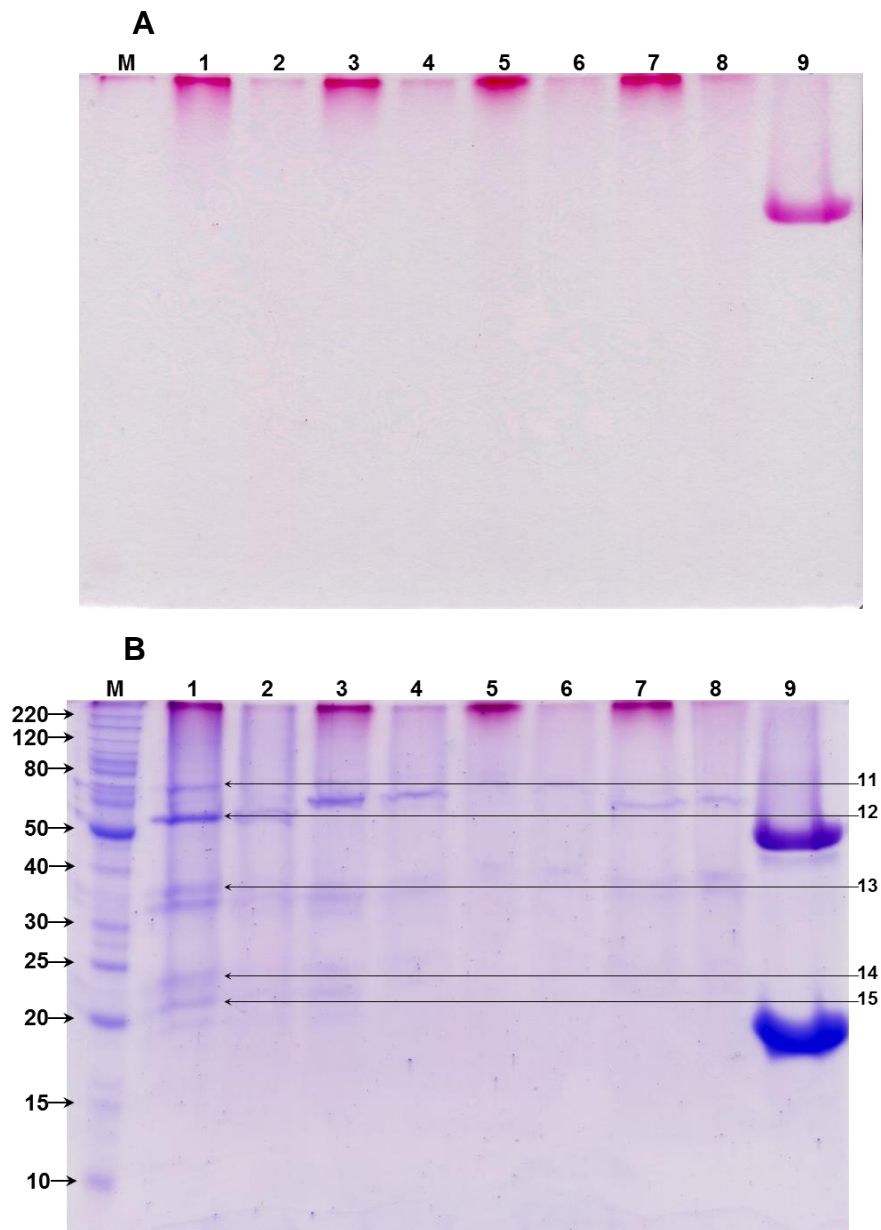


Figura 7. Glicoproteínas aisladas de la fracción hidrofóbica de las cuatro especies de amaranto mediante cromatografía de afinidad a lectinas.

Una fracción de las GBSS y de globulinas 11S están glicosiladas. **A**, Tinción para detección de glicoproteínas; **B**, Tinción con azul de Coomassie R-250. Carriles: M, Marcador de peso molecular (kDa); 1. *A. hybridus* hidrofóbica ConA; 2. *A. hybridus* hidrofóbica WGA; 3. *A. powellii* hidrofóbica ConA; 4. *A. powellii* hidrofóbica WGA; 5. *A. cruentus* hidrofílica ConA; 6. *A. cruentus* hidrofóbica WGA; 7. *A. hypochondriacus* hidrofóbica ConA; 8. *A. hypochondriacus* hidrofóbica WGA; 9. Controles. Positivo peroxidasa de rábano (40 kDa); Negativo inhibidor de tripsina de soja (21.5 kDa).

realizar tinción específica para glicoproteínas (Figuras 6A y 7A), el número de bandas observado es muy reducido comparado con el que se obtiene después de someter el mismo gel a tinción con azul de Coomassie (Figuras 6B y 7B). Esto puede deberse a que la cantidad individual de cada una de las glicoproteínas presentes en el gel no es suficiente para cumplir con el umbral de detección mediante el método PAS. La tinción con azul de Coomassie permite apreciar que, a pesar de que cada una reconoce residuos de carbohidratos distintos, la afinidad de las lectinas utilizadas ConA y WGA es redundante. Sin embargo, es evidente que la ConA posee una capacidad de unión mayor que la WGA para las proteínas analizadas. Esto es contrastante con lo reportado para el análisis del glicoproteoma de pericarpio de tomate, donde a pesar de utilizar cuatro lectinas distintas con afinidad por el mismo tipo de carbohidrato, los patrones electroforéticos de las glicoproteínas que interactúan con cada una de ellas es distinto (Ruiz-May et al., 2014). Un aspecto notable es que a pesar de las grandes diferencias apreciadas en el perfil electroforético de la fracción hidrofílica íntegra (Figuras 3 y 4) de las semillas de las cuatro especies de amaranto, el perfil de las glicoproteínas es el mismo para todas las especies, lo que sugiere un mecanismo de glicosilación muy conservado en cuanto a las proteínas blanco susceptibles de ser glicosiladas. Dentro de las glicoproteínas identificadas mediante espectrometría de masas (Tabla 6, Tabla Suplementaria S4) se encuentran HSP's previamente mencionadas, proteínas involucradas en el ciclo de los ácidos tricarbónicos como piruvato descarboxilasa, enzimas relacionadas con el plegamiento de proteínas como disulfuro isomerasas, y glucosiltransferasas encargadas de la síntesis de pared celular (Chakravarthi et al., 2006; Zeng et al.,

Tabla 6. Identificación de glicoproteínas en las fracciones hidrofílica e hidrofóbica de las semillas de las cuatro especies de amaranto

No Banda ¹	Proteína Identificada	Organismo	Número de acceso ²
1	Heat shock protein 90	<i>Catharanthus roseus</i>	gi 348696
2	HSP70	<i>Triticum aestivum</i>	gi 2827002
3	Pyruvate decarboxylase	<i>Fragaria x ananassa</i>	gi 10121330
5	Protein disulfide-isomerase	<i>Beta vulgaris</i>	gi 731312437
7	Globulin-like protein	<i>Daucus carota</i>	gi 1276946
8	PreproMP27-MP32	<i>Cucurbita</i> cv. Kurokawa Amakuri	gi 691752
10	11S globulin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 558149
14 A. hyb	11S globulin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 558149
15 A. hyb	11S globulin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 558149

¹ Numero de banda correspondiente al indicado en las Figura 6 y 7 y especie de amaranto correspondiente; **A. hyb**, *A. hybridus*; **A. pow**, *A. powellii*; **A. cru**, *A. cruentus*; **A. hyp**, *A. hypochondriacus*.² Numero de acceso de acuerdo a NCBI.

2010).

Es muy común que las SSP presenten glicosilaciones durante su paso a través del retículo endoplásmico. En ocasiones, las N-glicosilaciones son removidas durante su procesamiento y deposición, sin embargo, en otros casos éstas persisten y están presentes en la SSP madura (Tandang-Silvas et al., 2011). Generalmente las globulinas 11S no presentan glicosilaciones, pero existen excepciones a esta característica, como la α -conglutina de lupino (Duranti et al., 2008), la cocosina de coco (García et al., 2005) y la legumina Cal-1 de café (*Coffea arabica*) (Batista-Coelho et al., 2010). En este trabajo se encontró que una fracción las globulinas 11S de amaranto presenta glicosilaciones en su subunidad β (Bandas 10, 14 y 15 Figuras 6B y 7B, Tabla 6, Tabla Suplementaria S4). Estas modificaciones postraduccionales repercuten en las propiedades fisicoquímicas y de superficie de las proteínas como solubilidad, y están vinculadas con el mantenimiento de la estructura tridimensional nativa. Sin embargo, en proteínas de reserva de semillas, las glicosilaciones están involucradas con el desencadenamiento de reacciones alérgicas (Lauc et al., 2014; Ogawa y Date, 2014). Así, las globulinas 11S de las especies silvestres y domesticadas de amaranto, constituyen un sistema interesante para el estudio del impacto de las glicosilaciones en estas propiedades, tanto las relacionadas a incrementar la aplicabilidad de las proteínas de reserva de estas semillas en sistemas alimentarios, como las relacionadas a la respuesta inmune y que podrían incidir en el posible desarrollo de alergias.

4. Perspectivas

A raíz de los resultados obtenidos, se ha decidido proceder con la realización de un análisis proteómico más fino mediante electroforesis 2D. Los resultados preliminares obtenidos (Figura 8 y Figuras Suplementarias S1, S2 y S3), muestran un universo aun mayor de posibles recursos biotecnológicos contenidos en las semillas de las distintas especies de amaranto.

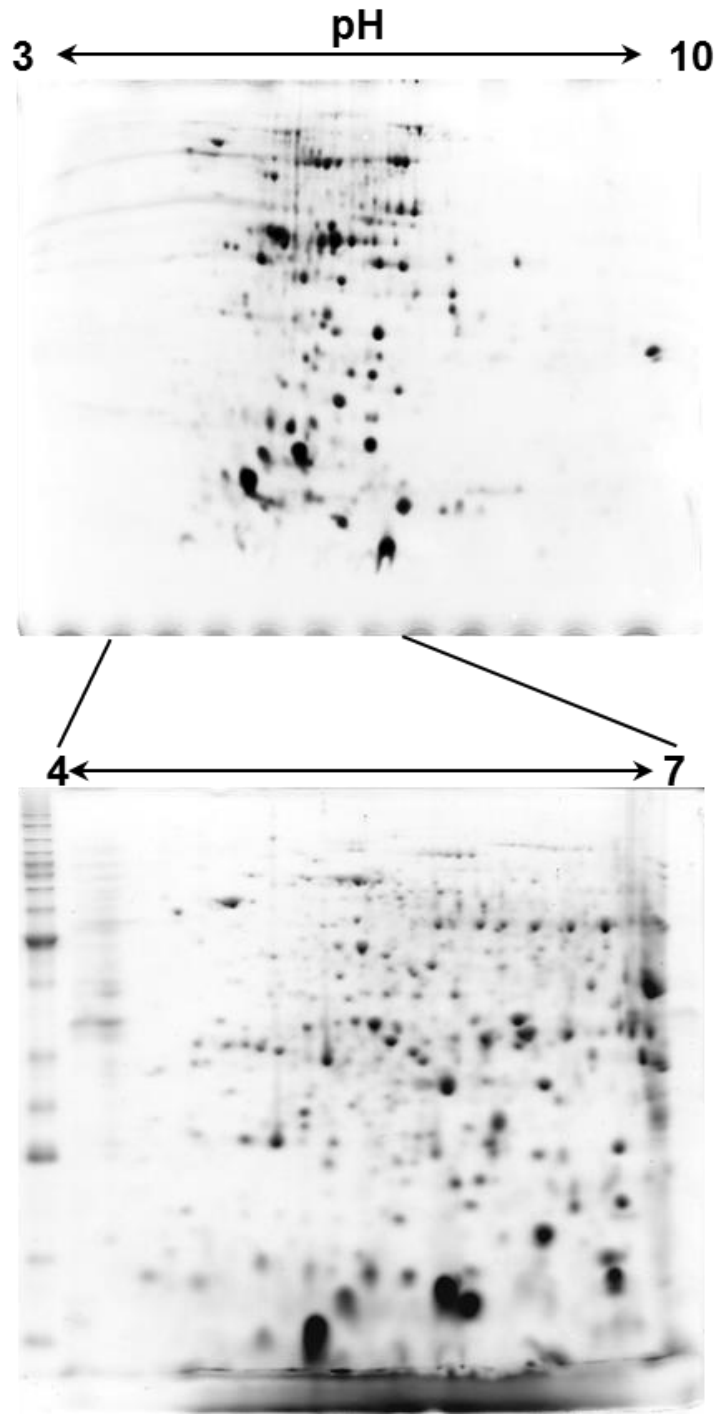


Figura 8. Perfil 2DE de la fracción hidrofílica de *A. hybridus* en rangos de pH 3-10 y 4-7.

5. Conclusiones

Este trabajo representa la primera aproximación desde un enfoque proteómico al estudio de las semillas de distintas especies de amaranto. El primer resultado obtenido demuestra que la especie silvestre *A. powellii* es el ejemplar con mayor contenido de proteína total, lo que la hace atractiva para su aplicación en programas de mejoramiento agrícola, para incrementar el contenido de proteína de las especies domesticadas destinadas a consumo humano. Existen diferencias evidentes entre los patrones electroforéticos de las proteínas hidrofílicas e hidrofóbicas de las semillas de las cuatro especies de amaranto estudiadas. Dentro de estas diferencias existen proteínas relacionadas con mecánica y estructura celular, lo que puede sugerir que cada especie responde y se comporta de forma específica a procesos dinámicos como como la germinación o transporte intra e intercelular. La identificación de HSP's, proteínas de resistencia a estrés oxidante y proteínas LEA, acumuladas mayoritariamente en semillas de las especies silvestres, indica que *A. hybridus* y *A. powellii* están mejor acondicionadas para desarrollarse en ambientes adversos expuestas a diversos tipos de estrés abiótico, debido a que se ven en la necesidad de sobrevivir y perpetuarse en la naturaleza. Cada una de las especies de amaranto estudiadas presentó isoformas distintas de GBSS's, esto sugiere que la calidad del almidón puede variar entre especies, lo cual además es soportado por las distintas estructuras observadas para los gránulos de almidón, por lo que sería interesante evaluar el desempeño de las GBSS's de forma individual. Existe una gran diversidad de proteínas de reserva entre las semillas de las cuatro especies de amaranto, especialmente variaciones de globulinas 11S, ocasionado posiblemente

por la presencia de múltiples genes que codifican para esta proteína o a modificaciones postraduccionales realizadas diferencialmente entre las especies, lo que representa una fuente muy extensa de proteínas con características nutricionales, nutracéuticas y fisicoquímicas distintas para su incorporación en tecnologías de alimentos. El patrón electroforético de las glicoproteínas aisladas a partir de la fracción hidrofílica de las semillas de las cuatro especies de amaranto, es prácticamente el mismo, a pesar de la gran variabilidad observada en el patrón electroforético de la fracción hidrofílica íntegra. Esto indica que los mecanismos de glicosilación están muy conservados entre especies silvestres y domesticadas, lo cual invita a estudiar este proceso más a detalle. Los resultados generados en este trabajo evidencian que la diversidad del germoplasma del amaranto, no se limita a variaciones a nivel de secuencia de DNA, sino también a nivel proteómico, tanto en contenido como en perfiles de acumulación de proteínas, lo que deja en claro la riqueza contenida en las distintas especies de esta planta para la búsqueda y obtención de proteínas con amplia aplicabilidad agrobiotecnológica.

Referencias

- Achary V.M.M., Reddy C.S., Pandey P., Islam T., Kaul T. y Reddy M.K. (2015) Glutathione reductase a unique enzyme: molecular cloning, expression and biochemical characterization from the stress adapted C4 plant, *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. *Molecular Biology Reports*, 42, 947-962.
- Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Sahi C., Gallie D. y Grover A. (2001) Arabidopsis thaliana Hsp100 proteins: kith and kin. *Cell Stress and Chaperones*. 2001, 63-219.
- Aguilar-Hernández H.S., Santos L., León-Galván F., Barrera-Pacheco A., Espitia-Rangel E., De León-Rodríguez A., Guevara-González R.G. y Barba de la Rosa A.P. (2011) Identification of calcium stress induced genes in amaranth leaves through suppression subtractive hybridization. *Journal of Plant Physiology*, 168, 2102-2109.
- Alvarez-Jubete L., Arendt E.K. y Gallagher E. (2009) Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60, 240257.
- Alvarez-Jubete L., Arendt E.K. y Gallagher E. (2010) Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 106-113.
- Apel K. y Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-99.
- Barba de la Rosa A.P., Montoya A.B., Martínez-Cuevas P., Hernández-Ledesma B., León-Galván M.F., De León-Rodríguez A., González C. (2010) Tryptic amaranth glutelin digests induce endothelial nitric oxide production through inhibition of ACE: antihypertensive role of amaranth peptides. *Nitric Oxide*, 23, 106-11.
- Barba de la Rosa A.P., Paredes-Lopez O., y Gueguen J. Characterization of amaranth globulins by ultracentrifugation and chromatographic techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40, 937-940.
- Batista-Coelho M., Rodrigues-Macedo M.L., Marangoni S., Soares da Silva D., Cesarino I. y Mazzafera P. (2010) Purification of legumin-like proteins from *Coffea arabica* and *Coffea racemosa* seeds and their insecticidal properties toward cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3050-3055.
- Batra G., Chauhan V. S., Singh A., Sarkar N.K., Grover A. (2007) Complexity of rice Hsp100 gene family: lessons from rice genome sequence data. *Journal of Biosciences*, 32, 611-619.
- Battaglia M. y Covarrubias A.A. (2013) Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in legumes. *Frontiers in Plant Science*, doi: 10.3389/fpls.2013.00190.
- Bressani R., García-Vela L.A. (1990) Protein fractions in amaranth grain and their chemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1205-1209.
- Campbell J.L., Klueva N.Y., Zheng H.G., Nieto-Sotelo J., Ho T.-H.D. y Nguyen H.T. (2001) Cloning of new members of heat shock protein HSP101 gene family

- in wheat (*Triticum aestivum* (L.) Moench) inducible by heat, dehydration, and ABA. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1517, 270-277.
- Carrasco-Peña L., Osuna-Castro J.A., De León-Rodríguez A., Maruyama N., Toro-Vazquez J.F., Morales-Rueda J.A. y Barba de la Rosa AP. (2013) Modification of solubility and heat-induced gelation of amaranth 11S globulin by protein engineering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3509-3516.
- Chakravarthi S., Jessop C.E. y Bulleid N.J. (2006) The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *European Molecular Biology Organization Reports*, 7:271-275.
- Daloso D.M., Müller K., Obata T., Florian A., Tohge T., Bottcher A., Riondet C., Bariat L., Carrari F., Nunes-Nesi A., Buchanan B.B., Reichheld J-P., Araújo W.L. y Fernie A.R. (2015) Thioredoxin, a master regulator of the tricarboxylic acid cycle in plant mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, E1392-E1400.
- Das K. y Roychoudhury A. (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, doi: 10.3389/fenvs.2014.00053.
- Duranti M., Consonni A., Magni C., Sessa F. y Scarafoni A. (2008) The major proteins of lupin seed: Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 624-633.
- Escobedo-López D., Nuñez-Colin C.A. y Espitia-Rangel E. (2012). Distribución del amaranto cultivado y sus parientes silvestres y posibles zonas de adaptación en México. En: *Amaranto: Ciencia y Tecnología*. Eduardo Espitia Rangel (Ed). Libro científico No. 2. INIFAP/SINAREFI. México, p.p. 203-211.
- Fink A.L. (1999) Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Reviews*, 79, 425-449
- Gallardo K., Job C., Groot S.P.C., Puype M., Demol H., Vandekerckhove J. y Job D. (2001) Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming. *Plant Physiology*, 126, 835-848.
- García R.N., Arocena R.V., Laurena A.C. y Tecson-Mendoza E.M. (2005) 11S and 7S globulins of coconut (*Cocos nucifera* L.): Purification and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1734-1739.
- Gomes L.C., Senna R., Sandim V., Silva-Neto M.A.C. Perales J.E.A., Zingali R.B., Soares M.R. y Fialho E. Four conventional soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seeds exhibit different protein profiles as revealed by proteomic analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1283–1293.
- González-Pérez S. y Vereijken J.M. (2007) Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2173-2191.
- Gorinstein S., Pawelzik E., Delgado-Licon E., Haruenkit R., Weisz M. y Trakhtenberg S. (2002) Characterisation of pseudocereal and cereal proteins by protein and amino acid analyses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 886-891.

- Guzmán C., Ortega R., Yamamori Y., Peña R.J. y Alvarez J.B. (2015) Molecular characterization of two novel null waxy alleles in Mexican bread wheat landraces. *Journal of Cereal Science*, 62, 8-14.
- Hajduch M., Casteel J.E., Tang S., Hearne L.B., Knapp S. y Thelen J.J. (2007) Proteomic analysis of near-isogenic sunflower varieties differing in seed oil traits. *Journal of Proteome Research*, 6, 3232-3241.
- Hanashiro I., Itoh K., Kuratomi Y., Yamazaki M., Igarashi T., Matsugasako J.y Takeda Y. (2008) Granule-bound starch synthase I is responsible for biosynthesis of extra-long unit chains of amylopectin in rice. *Plant and Cell Physiology*. 49, 925-933.
- Huerta-Ocampo J.A. y Barba de la Rosa A.P. (2011) Amaranth: a pseudo-cereal with nutraceutical properties. *Current Nutrition & Food Science*, 7, 1-9.
- Huerta-Ocampo J.A., Barrera-Pacheco A., Mendoza-Hernández C.S., Espitia-Rangel E., Mock H.P., Barba de la Rosa A.P. (2014) Salt stress-induced alterations in the root proteome of *Amaranthus cruentus* L. *Journal of Proteome Research*, 13, 3607-3627.
- Huerta-Ocampo J.A., León-Galván M.F., Ortega-Cruz L.B., Barrera-Pacheco A., De León-Rodríguez A., Mendoza-Hernández G. y Barba de la Rosa A.P. (2010) Water stress induces up-regulation of DOF1 and MIF1 transcription factors and down-regulation of proteins involved in secondary metabolism in amaranth roots (*Amaranthus hypochondriacus* L.). *Plant Biology*, 13, 472-482.
- Hundertmark M. y Hinch D.K. (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9:118 doi:10.1186/1471-2164-9-118.
- Hong-Bo S., Zong-Suo L., Ming-An S. (2005) LEA proteins in higher plants: Structure, function, gene expression and regulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45, 131–135.
- Izumo A., Fujiwara S., Sakurai T., Ball S.G., Ishii T., Ono H., Yoshida M., Fujita N., Nakamura Y., Buléon A., y Tsuzuki M. (2011) Effects of granule-bound starch synthase I-defective mutation on the morphology and structure of pyrenoidal starch in *Chlamydomonas*. *Plant Science*, 180, 238-245
- Jeon J-S., Ryoo N., Hahn T-R., Walia H., Nakamura Y. (2010) Starch biosynthesis in cereal endosperm. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 383-392.
- Jiang C., Cheng Z., Zhang C., Yu T., Zhong Q., Shen J.Q. y Huang X. (2014) Proteomic analysis of seed storage proteins in wild rice species of the *Oryza* genus. *Proteome Science*, 12:51, doi:10.1186/s12953-014-0051-4.
- Kietlinski K.D., Jimenez F., Jellen E.N., Maughan P.J., Smith S.M. y Pratt D.B. (2014) Relationships between the weedy *Amaranthus hybridus* (Amaranthaceae) and the grain amaranths. *Crop Science*, 54, 220–228.
- Kirchhausen T., Owen D., y Harrison S.C. (2014) Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*, 6:a016725.
- Kitakura S., Vanneste S., Robert S., Löffke C., Teichmann T., Tanaka H, y Friml J. (2011) Clathrin mediates endocytosis and polar distribution of PIN auxin transporters in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23, 1920-1931.

- Komatsu S. y Ahsan A. (2009) Soybean proteomics and its application to functional analysis. *Journal of Proteomics*, 72, 325-336.
- Kottapalli K.R., Payton P., Rakwal R., Agrawal G.K., Shibato J., Burow M. y Puppala N. (2008) Proteomics analysis of mature seed of four peanut cultivars using two-dimensional gel electrophoresis reveals distinct differential expression of storage, anti-nutritional, and allergenic proteins. *Plant Science*, 175, 321–329.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lauc G., Krištić J. y Zoldoš V. (2014) Glycans-the third revolution in evolution. *Frontiers in Genetics*, doi: 10.3389/fgene.2014.00145.
- Le Roy C. y Wrana J.L. (2005) Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signaling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 112-126.
- Maldonado-Cervantes E., Huerta-Ocampo J.A., Montero-Morán G.M., Barrera-Pacheco A., Espitia-Rangel E., Barba de la Rosa A.P. (2014) Characterization of *Amaranthus cruentus* L. seed proteins by 2-DE and LC/MS–MS: Identification and cloning of a novel late embryogenesis-abundant protein. *Journal of Cereal Science*, 60, 172-178.
- Maldonado-Cervantes E., Jeong H.J., León-Galván F., Barrera-Pacheco A., de León-Rodríguez A., González de Mejía E., de Lumen B.O. y Barba de la Rosa A.P. (2010) Amaranth lunasin-like peptide internalizes into the cell nucleus and inhibits chemical carcinogen-induced transformation of NIH-3T3 cells. *Peptides*, 31:1635-1642.
- Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F. y Noctor G. (2010) Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 61, 4197-4220.
- Miernyk J.A. y Hajduch M. (2011) Seed proteomics. *Journal of Proteomics*, 74:389-400.
- Mogk A., Schlieker C., Friedrich K.L., Schönfeld H., Vierling E., Bukau B. (2003) Refolding of substrates bound to small hsp80s relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 31033-31042.
- Nakamura Y. (2015) Biosynthesis of Reserve Starch. En: Starch Metabolism and Structure. Yasunori Nakamura (Ed.). Springer Japan, p.p. 161-209.
- Nakamoto K. y Vigh L. (2007) The small heat shock proteins and their clients. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 64, 294-306.
- Natarajan S., Xu C., Bae .H, Bailey B.A., Cregan P., Caperna T.J., Garrett W.M. y Luthria D. (2007). Proteomic and genetic analysis of glycinin subunits of sixteen soybean genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 436-444.
- Nieto-Sotelo J., Kannan K.B., Martínez L.M. y Segal S. (1999) Characterization of a maize heat-shock protein 101 gene, HSP101, encoding a ClpB/Hsp100 protein homologue. *Gene*, 230, 187-195.
- Ogawa H. y Date K. (2014) The “white kidney bean incident” in Japan. En: Lectins Methods and Protocols. Jun Hirabayashi (Ed.). Springer New York, p.p. 39-46.

- Ortega R., Guzmán C., Alvarez J.B. (2015) Molecular characterization of several Wx alleles in durum wheat. *Biologia Plantarum*, 59, 220-226
- Ortega R., Guzmán C., Alvarez J.B. (2014) Wx gene in diploid wheat: molecular characterization of five novel alleles from einkorn (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum*) and *T. urartu*. *Molecular Breeding*, 34, 1137-1146.
- Osuna-Castro J.A., Rascón-Cruz Q., Napier J., Fido R.J., Shewry P.R. y Paredes-López O. (2000) Overexpression, purification, and in vitro refolding of the 11S globulin from amaranth seed in *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5249-5255.
- Palomino G., Reyes R.V., Martínez J. y Mapes Sánchez C. (2012) Número cromosómico (2n) y cariotipo en especies de grano y verdura de *Amaranthus* spp. de México. En: *Amaranto: Ciencia y Tecnología*. Eduardo Espitia Rangel (Ed). Libro científico No. 2. INIFAP/SINAREFI. México, p.p. 215-226
- Preissner K.T. (1991) Structure and biological role of vitronectin. *Annual Review of Cell Biology*, 7, 275-310.
- Richter K., Haslbeck M. y Buchner J. (2010) The heat shock response: Life on the verge of death. *Molecular Cell*, 40, 253-266.
- Ruiz-May E., Hucko S., Howe K.J., Zhang S., Sherwood R.W., Thannhauser T.W. y Rose J.K. (2013) A comparative study of lectin affinity based plant N-glycoproteome profiling using tomato fruit as a model. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13, 566-579.
- Ruiz-May E., Thannhauser T.W., Zhang S. y Rose J.K. (2012) Analytical technologies for identification and characterization of the plant N-glycoproteome. *Frontiers in Plant Science*, doi: 10.3389/fpls.2012.00150.
- Silva-Sánchez C., Barba de la Rosa A.P., León-Galván M.F., de Lumen B. O., de León-Rodríguez A. y González de Mejía E. (2008) Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:1233-1240.
- Silva-Sánchez C., Chen S., Zhu N., Li Q-B y Chourey P.S. (2013) Proteomic comparison of basal endosperm in maize *miniature1* mutant and its wild-type *Mn1*. *Frontiers in Plant Science*, <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2013.00211>.
- Sevilla F., Camejo D., Ortiz-Espín A., Calderón A., Lázaro J.J. y Jiménez A. (2015) The thioredoxin/peroxiredoxin/sulfiredoxin system: current overview on its redox function in plants and regulation by reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Experimental Botany*, doi:10.1093/jxb/erv146.
- Shewry P.R. y Halford N.G. (2002) Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, 53, 947-958.
- Shewry P.R., Napier J.A. y Tatham A.S. (1995) Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *The Plant Cell*, 7, 945-956.
- Song W., Henquet M.G., Mentink R.A., van Dijk A.J., Cordewener J.H., Bosch D., America A.H. y van der Krol A.R. (2011) N-glycoproteomics in plants: perspectives and challenges. *Journal of Proteomics*, 74, 1463-1474.

- Song W., Mentink R.A., Henquet M.G., Cordewener J.H., van Dijk A.D., Bosch D., America A.H. y van der Krol A.R. (2013) N-glycan occupancy of Arabidopsis N-glycoproteins. *Journal of Proteomics* 93, 343-355.
- Sunil M., Hariharan A.K., Nayak S., Gupta S., Nambisan S.R., Gupta R.P., Panda B., Choudhary B. y Srinivasan S. (2014) The draft genome and transcriptome of *Amaranthus hypochondriacus*: a C4 dicot producing high-lysine edible pseudo-cereal. *DNA Research*, 21, 585-602.
- Switala J. y Loewen P.C. (2002) Diversity of properties among catalases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 401, 145-154.
- Tandang M.R.G., Atsuta N., Maruyama N., Adachi M. y Utsumi S. (2005) Evaluation of the solubility and emulsifying property of soybean proglycinin and rapeseed procruciferin in relation to structure modified by protein engineering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8736-8744.
- Tandang-Silvas M.R.G., Tecson-Mendoza E.M., Mikami B., Utsumi S. y Maruyama N. (2011) Molecular design of seed storage proteins for enhanced food physicochemical properties. *Annual Review of Food Science and Technology* 2, 59-73.
- Timperio A.M., Egidio M.G. y Zolla L. (2008) Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics*, 71, 391-411.
- Usman M.G., Rafii M.Y., Ismail M.R., Malek M.A., Latif M.A. y Oladosu Y. (2014) Heat shock proteins: functions and response against heat stress in plants. *International Journal of Scientific & Technology Research*, 3, 204-218.
- Valcárcel-Yamani B., Caetano da Silva Lannes S. (2012) Applications of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.) and amaranth (*Amaranthus* spp.) and their influence in the nutritional value of cereal based foods. *Food and Public Health*, 2, 265-275.
- Velarde-Salcedo A.J., Barrera-Pacheco A., Lara-González S., Montero-Morán G.M., Díaz-Gois A., González de Mejía E. y Barba de la Rosa A.P. (2013) In vitro inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins. *Food Chemistry*, 136, 758-764.
- Vigh L., Horváth I., Maresca B. y Harwood J.L. (2007) Can the stress protein response be controlled by “membrane-lipid therapy”? *Trends in biochemical sciences*, 32, 357-363.
- Wu T-M., Lin W-R., Kao C.H. y Hong C-Y. (2015) Gene knockout of glutathione reductase 3 results in increased sensitivity to salt stress in rice. *Plant Molecular Biology*, 87,555-564.
- Yoshida K., Hara S. y Hisabori T. (2015) Thioredoxin selectivity for thiol-based redox regulation of target proteins in chloroplasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 290, 14278-14288.
- Zeng W., Jiang N., Nadella R., Killen T.L., Nadella V. y Faik A. (2010) A glucurono(arabino)xylan synthase complex from wheat contains members of the GT43, GT47, and GT75 families and functions cooperatively. *Plant Physiology*. 154, 78-97.

Zhu J-K., Damsz B., Kononowicz A.K., Bressan R.A. y Hasegawa P.M. (1994) A higher plant extracellular vitronectin-like adhesion protein is related to the translational elongation factor-1 α . *The Plant Cell*, 6, 393-404.

ANEXOS

Tabla Suplementaria S1. Análisis estadístico del contenido de proteína de las semillas de las cuatro especies de amaranto determinado por el método de Bradford

Tabla Suplementaria S2. Identificación de proteínas en la fracción hidrofílica de las semillas de *A. hybridus*, *A. powellii*, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*

Tabla Suplementaria S3. Identificación de proteínas en la fracción hidrofóbica de las semillas de *A. hybridus*, *A. powellii*, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*

Tabla Suplementaria S4. Identificación de glicoproteínas en las fracciones hidrofílica e hidrofóbica de las semillas de *A. hybridus*, *A. powellii*, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*

Figura Suplementaria S1. Perfil 2DE de la fracción hidrofílica de *A. powellii* en rangos de pH 3-10 y 4-7.

Figura Suplementaria S2. Perfil 2DE de la fracción hidrofílica de *A. cruentus* en rangos de pH 3-10 y 4-7.

Figura Suplementaria S3. Perfil 2DE de la fracción hidrofílica de *A. hypochindriacus* en rangos de pH 3-10 y 4-7.

Tabla Suplementaria S1. Análisis estadístico del contenido de proteína de las semillas de las cuatro especies de amaranto determinado por el método de Bradford

Fracción hidrofílica				
Comparación	Diferencia de Medias	t	P	Diferencia significativa
<i>A. hybridus</i> vs. <i>A. powellii</i>	0.733	0.847	0.421	No
<i>A. hybridus</i> vs. <i>A. cruentus</i>	3	3.467	0.017	Si
<i>A. hybridus</i> vs. <i>A. hypochondriacus</i>	6.467	7.473	<0.001	Si
<i>A. powellii</i> vs. <i>A. cruentus</i>	3.733	4.314	0.01	Si
<i>A. powellii</i> vs. <i>A. hypochondriacus</i>	7.2	8.32	<0.001	Si
<i>A. cruentus</i> vs. <i>A. hypochondriacus</i>	3.467	4.006	0.012	Si
Fracción hidrofóbica				
Comparación	Diferencia de Medias	t	P	Diferencia significativa
<i>A. hybridus</i> vs. <i>A. powellii</i>	22.467	9.033	<0.001	Si
<i>A. hybridus</i> vs. <i>A. cruentus</i>	16.933	6.808	<0.001	Si
<i>A. hybridus</i> vs. <i>A. hypochondriacus</i>	4.667	1.876	0.097	No
<i>A. powellii</i> vs. <i>A. cruentus</i>	39.4	15.84	<0.001	Si
<i>A. powellii</i> vs. <i>A. hypochondriacus</i>	27.133	10.909	<0.001	Si
<i>A. cruentus</i> vs. <i>A. hypochondriacus</i>	12.267	4.932	0.002	Si
Proteína total				
Comparación	Diferencia de Medias	t	P	Diferencia significativa
<i>A. hybridus</i> vs. <i>A. powellii</i>	21.733	6.711	<0.001	Si
<i>A. hybridus</i> vs. <i>A. cruentus</i>	13.933	4.303	0.005	Si
<i>A. hybridus</i> vs. <i>A. hypochondriacus</i>	1.8	0.556	0.594	No
<i>A. powellii</i> vs. <i>A. cruentus</i>	35.667	11.014	<0.001	Si
<i>A. powellii</i> vs. <i>A. hypochondriacus</i>	19.933	6.155	0.001	Si
<i>A. cruentus</i> vs. <i>A. hypochondriacus</i>	15.733	4.858	0.004	Si

Tabla Suplementaria S2. Identificación de proteínas en la fracción hidrofílica de las semillas de *A. hybridus*, *A. powellii*, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*

No Banda ¹	Proteína Identificada	Organismo	Número de acceso ²	Masa (kDa) Exp. ³	Masa (kDa) Teórica ⁴	Score ⁵	NP/%C ⁶	Secuencias de péptidos
1 A. hyb	Clathrin, heavy chain	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 30681617	193.3	194.4	186	5/3%	R.GNLPGAENLVVQR.F R.FQELFAQTK.Y R.QLIDQVVSTALPESK.S R.EGLVSDAIESFIR.A
	Catalase	<i>Beta vulgaris</i>	gi 731361773		57.2	65	3/8%	K.VDSELIYAYAK.I R.GSPETLRDPR.G R.EGNFDIVGNNFPVFFTR.D R.LGINYLQLPVNAPK.C
2 A. pow	Chaperone protein ClpB1-like isoform X1	<i>Citrus sinensis</i>	gi 568847666	135.2	101.4	196	6/10%	R.LIALDMGALVAGAK.Y R.ALVVAAQLSAR.Y R.VQLDSQPEEIDNLER.K R.AGLGRPQQPTGSFLFLGPTGVGK.T K.ALAEQLFDDENLLVR.I R.LDEIVVFDPLSHEQLR.K
3 A. hyb	Pollen allergen MetE, partial	<i>Amaranthus retroflexus</i>	gi 309756515	73.7	84.0	280	5/8%	K.SFSLLSLLPK.I K.GVTGFGFDLVR.G K.FALESFWDGK.S K.AGINVIQIDEAALR.E K.AAGASWIQLDEPLLVR.D
	5-methyltetrahydropteroyl triglutamate--homocysteine methyltransferase	<i>Eucalyptus grandis</i>	gi 702246375		85.1	193	4/6%	K.FALESFWDGK.S K.GVTGFGFDLVR.G K.GMLTGPVTILNWSFVR.N + Oxidation (M) K.AGINVIQIDEAALR.E
4 A. hyb	Agglutinin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 4929263	65.9	35.2	175	3/12%	R.ETNEAAALFR.S K.ILDPLAQFEVPSK.T R.LSTDNWILVDGNDPR.E
	Phosphoglucomutase 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 15223226		63.3	44	2/3%	K.FFEVPTGWK.F K.LVTVEDIVR.Q
	LEA protein group 3 Heat shock 70 protein	<i>Brassica napus</i> <i>Spinacia oleracea</i>	gi 213053669 gi 2654210		43.5 72.6	41 37	1/2% 2/3%	K.AGEYKDYTVEK.A K.EIEDAVSDLR.S K.AVVTVPAYFNDAQR.Q
4 A. pow	Agglutinin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 4929263	66.8	35.2	122	3/12%	R.ETNEAAALFR.S K.ILDPLAQFEVPSK.T R.LSTDNWILVDGNDPR.E
	Heat shock 70 protein	<i>Spinacia oleracea</i>	gi 2654210		72.6	115	3/5%	K.EIEDAVSDLR.S K.AVVTVPAYFNDAQR.Q K.MLGEFELQGIPPAPR.G + Oxidation (M)
	V-type proton ATPase catalytic subunit A	<i>Setaria italica</i>	gi 514709242		68.6	111	3/6%	R.VGHDNLIGEIIIR.L K.IAADTPLLTGQR.V R.TTLVANTSNMPVAAR.E + Oxidation (M)
5 A. hyb	Granule-bound starch synthase I	<i>Amaranthus cruentus</i>	gi 260268387	63.5	67.6	376	9/20%	K.TGGLGDVLGGLPPAAR.G K.AGADYEDNQLR.F

								R.VVTVSPYYAQELISGVER.G K.EALQAEVGLPVDR.N R.NIPLIGFIGR.L K.GSDILAEAIPIR.F K.ENVQIVVLGTGK.E K.QIEQLEILYPEK.A R.YGTVPVVASTGGLVDTVK.E
5 A. pow	Granule-bound starch synthase I	<i>Amaranthus cruentus</i>	gi 260268387	63.1	67.6	193	4/8%	K.TGGLGDVVLGGLPPALAAR.G R.IFVDHPLFLAR.V K.EALQAEVGLPVDR.N K.EGYTGFHMGR.F + Oxidation (M) R.LSGTGSEGATIR.L
6 A.hyb	Phosphoglucomutase Granule-bound starch synthase I	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Amaranthus cruentus</i>	gij2829893 gi 260268387		63.2	79	1/2%	
	Chaperonin CPN60-2	<i>Beta vulgaris</i>	gi 731372887		61.3	99	4/8%	K.TGGLGDVVLGGLPPALAAR.G K.ENVQIVVLGTGK.E K.QIEQLEILYPEK.A K.GIEELADAVK.V K.TLFNELEVVEGML + Oxidation (M) K.IGGASEAEVGEK.K R.GYISPYFITNQK.T
7 A. cru	ATP synthase subunit alpha	<i>Phaseolus vulgaris</i>	gi 114411	56.7	55.6	223	5/11%	R.AAELTTLESR.M R.VVSVGDGIAR.V R.VVDALGVPIDGR.G R.EAFPQDVLYLHSR.L K.QPQYAPLPIEK.Q K.NLLEEEAIR. R.TFAYADTHR.Y R.LGINYLQLPVNAPK R.DEEIDYFPSR.F R.TSVPSIWAIGDVTNR.M
	Catalase	<i>Beta vulgaris</i>	gi 731361773		57.2	104	4/8%	
	Glutathione reductase precursor, partial	<i>Spinacia oleracea</i>	gi 529375		53.0	42	1/3%	R.TSVPSIWAIGDVTNR.M
8 A. hyb	Enolase	<i>Beta vulgaris</i>	gi 731345370	50.9	48.3	198	3/11%	R.GNPTVEADVHLDDGTYAR.A K.AVQNVNEIIGPALVGK.D K.VNQIGSVTESIEAVK.M K.VKDLSQADFGRL R.LVGVSEETTTGVK.R
	Adenosylhomocysteinase	<i>Phalaenopsis sp</i>	gij1710841		53.8	83	2/4%	
8 A. pow	Enolase	<i>Spinacia oleracea</i>	gi 8919731	51.4	48.4	248	4/13%	R.AGWGV M ASHR.S + Oxidation (M) R.AAVPSGASTGIYEALER.D K.AVQNVNEIIGPALVGK.D K.VQIVGDDLLVTNPK.R R.TEFGPSQPFK.G R.HSLPDGL M R.A + Oxidation (M)
	Adenosylhomocysteinase	<i>Phalaenopsis sp</i>	gij1710841		53.8	50	2/3%	
8 A. cru	Enolase	<i>Solanum lycopersicum</i>	gi 1161573	50.9	35.3	114	2/10%	K.VQIVGDDLLVTNPK.R K.LVLPVPAFNVINGGSHAGNK.L
9 A. hyb	Elongation factor 1-alpha	<i>Malus domestica</i>	gi 9802384		49.8	168	4/14%	R.VETGIVKPGM V VTFGPTGLTTEVK.S + Oxidation (M) K. M LPTKPM V VETTFSEYPLGR.F + 2 Oxidation (M)

								K.IGGIGTVPVGR.V R.STNLDWYK.G
9 A. pow	Translation elongation factor 1A-9	<i>Gossypium hirsutum</i>	gi 74486744	49.3	49.7	67	2/6%	K.IGGIGTVPVGR.V K.MVPTKPMVLVETFSEYPPLGR.F + 2 Oxidation (M)
9 A. cru	Elongation factor 1-alpha	<i>Panax notoginseng</i>	gi 721685073	49.4	49.7	183	3/12%	R.EHALLAFTLGVK.Q R.VETGTLKPGM ^M VVTFGPTGLTTEVK.S + Oxidation (M) K.M ^I PTKPM ^M VVETFSEYPPLGR.F + 2 Oxidation (M)
9 A. hyp	Elongation factor 1-alpha	<i>Saccharum officinarum</i>	gi 9802384	49.3	49.6	159	3/12%	R.EHALLAFTLGVK.Q R.VETGVLKPGM ^M VVTFGPTGLTTEVK.S + Oxidation (M) K.M ^I PTKPM ^M VVETFSEYPPLGR.F + 2 Oxidation (M)
10 A. hyb	Malate dehydrogenase	<i>Medicago sativa</i>	gi 11133373	39.8	35.6	237	3/14%	R.VLVTGAAGQIGYALVPM ^I AR.G + Oxidation (M) K.MELVDAAFPLLK.G K.VLVVANPANTNALILK.E
	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	<i>Medicago truncatula</i>	gi 357477179		36.8	216	4/15%	K.YDSVHGQWK.N R.FGIVEGLM ^T TTVHSITATQK.T + Oxidation (M) R.VPTVDVSVV ^D LTVR.L K.AGIALNDNFVK.L
10 A. pow	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	<i>Manihot irwinii</i>	gi 262316938	39.8	13.3	310	2/26%	R.FGIVEGLM ^T TTVHSITATQK.T R.VPTVDVSVV ^D LTVR.L
	Malate dehydrogenase	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	gi 12229778		35.9	149	4/17%	K.EFAPSIPEK.N K.MELVDAAFPLLK.G K.MELVDAAFPLLK.G + Oxidation (M) K.VLVVANPANTNALILK.E R.VLVTGAAGQIGYALVPM ^I AR.G + Oxidation (M)
10 A. cru	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	<i>Manihot irwinii</i>	gi 262316938	39.8	13.3	172	2/26%	R.FGIVEGLM ^T TTDHSITATQK.T R.VPTVDVSVV ^D LTVR.L
	Malate dehydrogenase	<i>Medicago sativa</i>	gi 11133373		35.9	81	3/14%	K.MELVDAAFPLLK.G K.VLVVANPANTNALILK.E R.VLVTGAAGQIGYALVPM ^I AR.G + Oxidation (M)
10 A. hyp	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	<i>Cicer arietinum</i>	gi 502135422	39.8	37.1	261	6/22%	K.YDTVHGGQWK.H R.FGIVEGLM ^T TTVHSITATQK.T R.AASFNIIPSSTGAAK.A R.VPTVDVSVV ^D LTVR.L K.AAIKEESEGK.L K.AGIALNDNFVK.V
	Malate dehydrogenase	<i>Gossypium hirsutum</i>	gi 211906490		35.9	208	4/18%	K.MELVDAAFPLLK.G + Oxidation (M) K.SQASALEQHAAPNCK.V K.VLVVANPANTNALILK.E

11	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Panax ginseng</i>	gi 34099812	38.0	31.9	231	4/19%	R.VLVTGAAGQIGYALVPMIAR.G + Oxidation (M) K.YDTVHGQWK.H R.AASFNIIPSSSTGAAK.A R.VPTVDVSVVDLTVR.L R.FGIVEGLMTTVHSITATQK.T + Oxidation (M)
11	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	<i>Antirrhinum majus</i>	gi 120666	38.4	36.8	183	3/13%	K.AGIALNDNFVK.L R.VPTVDVSVVDLTVR.L R.FGIVEGLMTTVHSITATQK.T + Oxidation (M)
	Malate dehydrogenase	<i>Medicago sativa</i>	gi 11133373		35.9	123	3/14%	K.MELVDAAFPLK.G + Oxidation (M) K.VLVVANPANTNALILK.E R.VLVTGAAGQIGYALVPMIAR.G + Oxidation (M)
11	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Antirrhinum majus</i>	gi 120666	38.4	36.8	142	2/9%	R.VPTVDVSVVDLTVR.L R.FGIVEGLMTTVHSITATQK.T + Oxidation (M)
	Malate dehydrogenase	<i>Medicago sativa</i>	gi 11133373		35.9	63	2/10%	K.VLVVANPANTNALILK.E R.VLVTGAAGQIGYALVPMIAR.G + Oxidation (M)
12	Agglutinin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 4929263	33.7	35.2	164	4/16%	R.ETNEAAALFR.S K.DVFHVIDWK.S K.ILDPLAQFEVEPSK.T R.SDVHDFNVISLLNMQK.T + Oxidation (M)
	Chain A, Structure Of Amaranth 11s Proglobulin Seed Storage Protein	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 371927419		52.9	71	2/6%	R.VQEGHLHVIKPPSR.A R.FYLAGKPKQEHSGEHQFSR.E
13	Agglutinin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 4929263	32.0	35.2	214	4/15%	R.ETNEAAALFR.S K.DVFHVIDWK.S K.ILDPLAQFEVEPSK.T R.LSTDNWILVDGNDPR.E
14	Agglutinin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 4929263	31.1	35.2	144	4/17%	K.DVFHVIDWK.S K.ILDPLAQFEVEPSK.T R.LSTDNWILVDGNDPR.E R.SDVHDFNVISLLNMQK.T + Oxidation (M)
	14-3-3 protein homologue	<i>Solanum lycopersicum</i>	gi 1168191		29.4	132	2/10%	K.DSTLIMQLLR.D K.SAQDIALAELAPTHPIR.L K.VNEGDFVWIPR.Y
	Globulin-like protein	<i>Daucus carota</i>	gi 1276946		53.9	97	1/2%	K.VNEGDFVWIPR.Y
15	60S ribosomal protein L6-1	<i>Vitis vinifera</i>	gi 225441385	30.2	25.9	85	4/16%	K.QLSSGLLLLITGPFK.I R.RVNQAYVIATSTK. R.VNQAYVIATSTK.V K.SGMKPHLVF. - + Oxidation (M)
	Globulin-like protein	<i>Daucus carota</i>	gi 1276946		53.9	60	1/2%	K.VNEGDFVWIPR.Y
16	Globulin-like protein	<i>Daucus carota</i>	gi 1276946	30.4	53.9	97	1/2%	K.VNEGDFVWIPR.Y
17	Amarandin-1, partial	<i>Amaranthus viridis</i>	gi 2735656	27.7	28.1	151	2/5%	K.LALMVIQITIAEAR.F

A. hyb	Globulin-like protein	<i>Daucus carota</i>	gij1276946		53.9	101	1/2%	K.KLALMVIQTIIEAAR.F K.VNEGDVFWIPR.Y
17	Amarandin-1, partial	<i>Amaranthus viridis</i>	gij2735656	27.4	28.1	137	3/10%	R.ASVGLGAKPLNK.F K.LALMVIQTIIEAAR.F
A. cru								K.KLALMVIQTIIEAAR.F + Oxidation (M) K.VNEGDVFWIPR.Y
18	Globulin-like protein 11S globulin	<i>Daucus carota</i> <i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gij1276946 gij558149		53.9 57.0	100 190	1/2% 3/8%	R.LTTVNSFNLPILR.H R.GQLVVVPQNFIVK.Q R.SLPIDVVSNIYQISR.E
A. cru				20.1				
19	Small heat shock protein	<i>Musa acuminata</i>	gij376341420	15.1	17.9	93	1/9%	K.ASMEDGVLTVTPK.Q
A. cru								
21	Late embryogenesis-abundant protein 11S globulin	<i>Glycine max</i>	gij1762955	11.2	11.5	58	1/11%	K.SLEAQQHLAEGR.S
A. hyb		<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gij122726601		55.4	55	1/1%	R.LTALEPTNR.I
22	11S globulin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gij122726601		55.4	64	1/1%	R.LTALEPTNR.I
A. hyp	Thioredoxin	<i>Capsicum annuum</i>	gij40287476		13.9	43	1/8%	R.FIAPILADIAK.K
24	Late embryogenesis-abundant protein 11S globulin	<i>Glycine max</i>	gij1762955	10.0	11.5	77	2/23%	R.QGETVVPGGTGGK.S K.SLEAQQHLAEGR.S
A. pow		<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gij122726601		55.4	45	1/1%	R.LTALEPTNR.I
24	Late embryogenesis-abundant protein	<i>Glycine max</i>	gij1762955		11.5	41	1/11%	K.SLEAQQHLAEGR.S
A. cru								
25	Histone H4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gij166740	9.7	11.4	98	3/31%	R.DAVTYTEHAR.R R.ISGLIYEETR.G R.DNIQGITKPAIR.R
A. hyp								R.GDFAIDIGR.N K.LIGATNPLASEPGTIR.G R.KLIGATNPLASEPGTIR.G
	Nucleoside diphosphate kinase I	<i>Spinacia oleracea</i>	gij218275		16.3	82	3/17%	R.QGETVVPGGTGGK.S K.SLEAQQHLAEGR.S
	Late embryogenesis-abundant protein	<i>Glycine max</i>	gij1762955		11.5	36	2/23%	K.SLEAQQHLAEGR.S
27	Late embryogenesis-abundant protein	<i>Glycine max</i>	gij1762955	7.7	11.5	81	1/11%	K.SLEAQQHLAEGR.S
A. pow	Glutaredoxin type 1	<i>Fritillaria agrestis</i>	gij2708324		11.3	36	1/9%	R.TVPNVFIGGK.H

¹ Numero de banda correspondiente al indicado en la Figura 4 y especie de amaranto correspondiente; **A. hyb**, *A. hybridus*; **A. pow**, *A. powellii*; **A. cru**, *A. cruentus*; **A. hyp**, *A. hypochondriacus*.² Numero de acceso de acuerdo a NCBI. ³ Peso molecular experimental. ⁴ Peso molecular teórico. ⁵ MASCOT score, iones individuales con valores de score > 35 son estadísticamente significativos ($p < 0.05$). ⁶ Número de péptidos/Porcentaje de cobertura de la secuencia.

Tabla Suplementaria S3. Identificación de proteínas en la fracción hidrofóbica de las semillas de *A. hybridus*, *A. powellii*, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*

No Banda ¹	Proteína Identificada	Organismo	Número de acceso ²	Masa (kDa) Exp. ³	Masa (kDa) Teórica ⁴	Score ⁵	NP/%C ⁶	Secuencias de péptidos
29 A. hyb	Granule-bound starch synthase I	<i>Amaranthus cruentus</i>	gi 260268387	118.8	67.6	197	6/11%	K.TGGLGDVGLGGLPPALAAR.G K.AGADYEDNQLR.F R.FALADYPR.L K.EALQAEVGLPVDR.N R.NIPLIGFIGR.L K.GSDILAEAIPIR.F
	Alpha-glucan phosphorylase	<i>Spinacia oleracea</i>	gi 1514639		110.7	178	4/5%	R.DAALGNGLGR.L K.DGQEEVAENWLEIANPWELVR.N R.TVAYTNHTVLPEALEK.W K.AFATYVQAK.R
30 A. hyb	Granule-bound starch synthase I	<i>Amaranthus cruentus</i>	gi 260268387	61.6	67.6	503	11/23%	K.TGGLGDVGLGGLPPALAAR.G R.VMTVSPR.Y + Oxidation (M) R.DGWDTSVTVEFQVGNR.T R.IFVDHPLFLAR.V K.AGADYEDNQLR.F K.EALQAEVGLPVDR.N R.NIPLIGFIGR.L K.ENVQIVVLGTGK.E K.QIEQLEILYPEK.A K.FNSPLAHMIVAGADFMLIPSR.F R.ALTTYNSPAMR.E
30 A. pow	Granule-bound starch synthase I	<i>Amaranthus cruentus</i>	gi 260268387	62.9	67.6	872	14/31%	K.ERFHAPFIR.S R.SGMNVFVGAEVAPWSK.T K.TGGLGDVGLGGLPPALAAR.G R.DGWDTSVTVEFQVGNR.T R.IFVDHPLFLAR.V K.AGADYEDNQLR.F R.FSLLCQAALAPR.V R.VVTVSPYYAQELISGVER.G K.EALQAEVGLPVDR.N R.NIPLIGFIGR.L K.GSDILAEAIPIR.F K.ENVQIVVLGTGK.E K.QIEQLEILYPEK.A K.FNSPLAHMIVAGADFMLIPSR.F
31 A. hyb	Granule-bound starch synthase I	<i>Amaranthus cruentus</i>	gi 260268387	57.6	67.6	799	13/28%	K.TGGLGDVGLGGLPPALAAR.G R.IFVDHPLFLAR.V K.AGADYEDNQLR.F R.FSLLCQAALAPR.V R.LHLPEELRPVFEFMDGYDRPIK.G + Oxidation (M) R.VVTVSPYYAQELISGVER.G

								R.GVELDDVVR.Q K.EALQAEVGLPVDR.N R.NIPLIGFIGR.L K.GSDILAEAIPR.F K.ENVQIVVLGTGK.E K.QIEQLEILYPEK.A R.ALTTYNSPAMR.E
31 A. pow	Granule-bound starch synthase I	<i>Amaranthus cruentus</i>	gi 260268387	53.6	67.6	599	11/26%	R.SGMNVVVFVGAEVAPWSK.T + Oxidation (M) K.TGGLGDVGLGPPALAAR.G R.DGWDTSVTVEFQVGNR.T R.LHLPEELRPVFEFMDGYDRPIK.G K.EALQAEVGLPVDR.N R.NIPLIGFIGR.L K.GSDILAEAIPR.F K.ENVQIVVLGTGK.E K.FNSPLAHMIVAGADFMLIPSR.F K.EGYTGFHMGR.F + Oxidation (M) R.ALTTYNSPAMR.E
32 A. pow	Vitronectin-like adhesion protein	<i>Nicotiana tabacum</i>	gi 439577	52.0	49.6	176	4/14%	K.STTTGHLIYK.L R.EHALLAFTLGVK.Q K.MIPTKPMVVETFSEYPPLGR.F + 2 Oxidation (M) R.VETGVLKPGMVVTFGPTGLTTEVK.S + Oxidation (M)
	Elongation factor	<i>Saccharum officinatum</i>	gi 9802384		49.7	176	4/14%	K.STTTGHLIYK.L R.EHALLAFTLGVK.Q K.MIPTKPMVVETFSEYPPLGR.F + 2 Oxidation (M) R.VETGVLKPGMVVTFGPTGLTTEVK.S + Oxidation (M)
	Agglutinin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 4929263		35.2	140	2/7%	R.ETNEAALFR.S K.ILDPLAQFEVPSK.T
	Granule-bound starch synthase	<i>Cucurbita moschata</i>	gi 343410565		68.5	86	3/6%	R.NIPLIGFIGR.L K.EALQAEVGLPVDR.N K.TGGLGDVGLGPPALAAR.G
34 A. hyb	Agglutinin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 4929263	43.0	35.2	73	2/7%	K.DVFHVIDWK.S K.ILDPLAQFEVPSK.T
35 A. hyb	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	<i>Oryza sativa</i>	gi 968996	40.6	36.6	105	3/11%	K.AGIALNDNFVK.L R.AASFNIIPSSTGAAK.A R.VPTVDVSVVDLTVR.L
35 A. cru	Malate dehydrogenase	<i>Zea mays</i>	gi 195626292	39.4	41.4	58	1/3%	K.GVDVVVIPAGVPR.K
	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	<i>Oryza sativa</i>	gi 968996		36.6	41	2/7%	R.AASFNIIPSSTGAAK.A K.AGIALNDNFVK.L
37 A. hyb	Agglutinin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 4929263	34.3	35.2	194	6/27%	R.ETNEAALFR.S K.DVFHVIDWK.S

								K.ILDPLAQFEVEPSK.T R.LSTDNWILVDGNDPR.E R.SDVHDFNVISLLNMQK.T + Oxidation (M) R.WSPNHYWITASANEPDENK.S
37 A. hyp	Agglutinin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 4929263	34.3	35.2	170	4/19%	R.ETNEAAALFR.S K.ILDPLAQFEVEPSK.T R.LSTDNWILVDGNDPR.E R.WSPNHYWITASANEPDENK.S
	11S globulin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 558149		55.4	138	3/8%	R.LTALEPTNR.I R.IQAEAGLTEVWDSNEQEFR.C R.LLAESFGVSEEEIAQK.L
38 A. hyb	11S globulin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 558149	32.0	55.4	145	3/8%	R.LTALEPTNR.I R.LLAESFGVSEEEIAQK.L R.IQAEAGLTEVWDSNEQEFR.C
	Agglutinin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 4929263		35.2	83	1/4%	K.ILDPLAQFEVEPSK.T
38 A. hyp	11S globulin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 558149	32.0	55.4	202	3/8%	R.LTALEPTNR.I R.LLAESFGVSEEEIAQK.L R.IQAEAGLTEVWDSNEQEFR.C
	Agglutinin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 4929263		35.2	78	1/4%	K.ILDPLAQFEVEPSK.T
	Putative glucose and ribitol dehydrogenase homolog	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 6729036		31.2	46	1/4%	K.VALVTGGDSGIGK.A
39 A. cru	Globulin-like protein	<i>Daucus carota</i>	gi 1276946	29.6	53.9	101	1/2%	K.VNEGDFVWIPR.Y
	11S globulin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 558149		55.4	83	3/7%	R.LTALEPTNR.I R.LTTVNSFNLPIR.H R.LLAESFGVSEEEIAQK.L
40 A.cru	Amarandin-1, partial	<i>Amaranthus viridis</i>	gi 2735656	28.6	28.1	142	2/9%	R.FTYIEGEIVSK.F K.LALMVIQTIAEAAR.F
	Globulin-like protein	<i>Daucus carota</i>	gi 1276946		53.9	91	1/2%	K.VNEGDFVWIPR.Y
41 A. hyb	11S globulin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 558149	21.6	55.4	109	1/2%	K.TSENAMFQSLAGR.T + Oxidation (M)
42 A. hyb	11S globulin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 558149	20.9	55.4	391	7/18%	K.FNRPETTLFR.S R.LTTVNSFNLPIR.H R.GQLVVVPQNFAIVK.Q K.QAFEDGFEWVSFK.T R.SLPIDVVSNIYQISR.E R.LAVNVDDPSKADVYTPEAGR.I R.SLPIDVVSNIYQISREEAFGLK.F
42 A. pow	11S globulin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 558149	20.9	55.4	114	3/7%	K.FNRPETTLFR.S K.TSENAMFQSLAGR.T R.GQLVVVPQNFAIVK.Q
42 A. cru	11S globulin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 558149	20.6	55.4	300	5/13%	R.SSGQGEYR.R K.FNRPETTLFR.S R.LTTVNSFNLPIR.H K.QAFEDGFEWVSFK.T

42	11S globulin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 558149	21.4	55.4	215	4/10%	R.LAVNVDDPSKADVTPPEAGR.L K.FNRPETTLFR.S K.TSENA MFQSLAGR.T K.TSENA MFQSLAGR.T + Oxidation (M) R.GQLVVVPQNFAIVK.Q R.SLPIDVVSNIYQISR.E
A. hyp								
43	11S globulin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 558149	19.1	55.4	90	2/5%	R.LTTVNSFNLPILR.H R.GQLVVVPQNFAIVK.Q
A. hyb								
44	11S globulin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 558149	17.1	55.4	70	2/5%	K.TSENA MFQSLAGR.T + Oxidation (M) R.LTTVNSFNLPILR.H
A. cru								
45	11S globulin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 558149	14.5	55.4	83	3/7%	R.LTALEPTNR.I R.VQEGLHVIKPPSR.A R.LLAESFGVSEEEIAQK.L
A. pow								
49	Agglutinin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 4929263	8.4	35.2	206	5/21%	R.ETNEAAALFR.S K.DVFHVIDWK.S K.ILDPLAQFEVPSK.T R.LSTDNWILVDGNDPR.E R.SDVHDFNVISLLNMQK.T + Oxidation (M)
A. hyp								

¹ Numero de banda correspondiente al indicado en la Figura 4 y especie de amaranto correspondiente; **A. hyb**, *A. hybridus*; **A. pow**, *A. powellii*; **A. cru**, *A. cruentus*; **A. hyp**, *A. hypochondriacus*.² Numero de acceso de acuerdo a NCBI. ³ Peso molecular experimental. ⁴ Peso molecular teórico. ⁵ MASCOT score, iones individuales con valores de score > 35 son estadísticamente significativos ($p < 0.05$). ⁶ Número de péptidos/ Porcentaje de cobertura de la secuencia.

Tabla Suplementaria S4. Identificación de glicoproteínas en las fracciones hidrofílica e hidrofóbica de las semillas de *A. hybridus*, *A. powellii*, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*

No Banda ¹	Proteína Identificada	Organismo	Número de acceso ²	Masa (kDa) Exp. ³	Masa (kDa) Teórica ⁴	Score ⁵	NP/%C ⁶	Secuencias de péptidos
1	Heat shock protein 90	<i>Catharanthus roseus</i>	gi 348696	117.2	93.6	56	3/4%	K.LGIIEDAANR.N K.LTSLDQYISR.M K.GLVDSDTLPLNVS.R.E
2	HSP70	<i>Triticum aestivum</i>	gi 2827002	97.0	71.4	321	7/11%	R.VEIIANDQG.NR.T R.FSDPSVQSDMK.L + Oxidation (M) K.NALENYAYNMR.N + Oxidation (M) K.VQQLQDFFNGK.E R.TTPSYVAFTDTER.L R.IINEPTAAAIAYGLDK.K R.IINEPTAAAIAYGLDKK.A
	Putative Luminal binding protein	<i>Oryza sativa</i>	gi 46391140		74.4	241	4/5%	K.FDLTGIAPAPR.G R.VEIIANDQG.NR.I R.IINEPTAAAIAYGIDK.K R.IINEPTAAAIAYGIDKK.G
3	Pyruvate decarboxylase	<i>Fragaria x ananassa</i>	gi 10121330	86.2	66.1	72	2/3%	R.EPVPFSLSPK.L R.VSAANSRPPNPQ.-
4	Pyruvate decarboxylase	<i>Fragaria x ananassa</i>	gi 10121330	73.5	66.1	62	2/3%	R.EPVPFSLSPK.L R.VSAANSRPPNPQ.-
5	Protein disulfide-isomerase	<i>Beta vulgaris</i>	gi 731312437	67.4	56.6	206	5/8%	K.FIEESSVPTLTLSK.D K.FFNSPNAK.A K.SKYEQVAAEYK.S K.YEQVAAEYK.S K.GYPTLYFR.S
7	Agglutinin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 4929263	35.3	35.2	109	2/7%	R.ETNEAAALFR.S K.ILDPLAQFEVPSK.T
	Globulin-like protein	<i>Daucus carota</i>	gi 1276946		53.9	82	1/2%	K.VNEGDVFWIPR.Y
8	PreproMP27-MP32	<i>Cucurbita cv.</i> Kurokawa Amakuri	gi 691752	29.6	57.2	67	2/5%	R.YFPFCQIASR. R.ILDRPMHIGFITMEPK.S + 2 Oxidation (M)
9	PreproMP27-MP32	<i>Cucurbita cv.</i> Kurokawa Amakuri	gi 691752	26.2	57.2	52	1/2%	R.YFPFCQIASR.T
10	11S globulin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 558149	21.81	55.4	353	5/11%	R.LAVNVDDPSK.A K.ADVYTPEAGR.L K.FNRPETTLFR.S K.TSENAMFQSLAGR.T R.LTTVNSFNLPILR.H
11 A. hyb	Granule-bound starch synthase I	<i>Amaranthus cruentus</i>	gi 260268387	63.5	67.6	424	12/27%	K.LTLANNALK.S R.SGMNVVFGAEVAPWSK.T + Oxidation (M) K.TGGLGDVGLGPPALAAAR.G R.IFVDHPLFLAR.V R.FSLLCQAALAPR.V

								R.VVTVSPYYAQELISGVER.G K.EALQAEVGLPVDR.N R.NIPLIGFIGR.L K.FNSPLAHMIVAGADFMLIPSR.F + 2 Oxidation (M) R.YGTVPVVASTGGLVDTVK.E K.EGYTGFHMGR.F + Oxidation (M) R.ALTTYNSPAMR.E
11 A. pow	Granule-bound starch synthase I	<i>Amaranthus cruentus</i>	gi 260268387	66.1	67.6	464	10/19%	K.TGGLGDVGLGPPALAAR.G R.IFVDHPLFLAR.V K.AGADYEDNQLR.F R.FSLCQAALAPR.V K.AGILQSDR.V K.EALQAEVGLPVDR.N R.NIPLIGFIGR.L K.GSDILAEIIPR.F K.EGYTGFHMGR.F + Oxidation (M) R.ALTTYNSPAMR.E
12 A. hyb	Granule-bound starch synthase I	<i>Amaranthus cruentus</i>	gi 260268387	51.3	67.6	77	2/3%	K.ENVQIVVLGTGK.E R.ALTTYNSPAMR.E + Oxidation (M)
13 A. hyb	Agglutinin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 4929263	34.8	35.2	164	5/21%	K.TYDGLVHIK.S R.ETNEAALFR.S K.ILDPLAQFEVEPSK.T R.LSTDNWILVDGNDPR.E R.YQSDNIQQYGLLQFSADK.I
14 A. hyb	11S globulin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 558149	23.3	55.4	337	5/13%	K.ADVYTPEAGR.L K.TSENAFQSLAGR.T K.TSENAFQSLAGR.T + Oxidation (M) R.LTTVNSFNLPIR.H R.GQLVVVPQNFAIVK.Q R.SLPIDVVSNIYQISR.E
15 A. hyb	11S globulin	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 558149	21.6	55.4	247	7/17%	R.LTALEPTNR.I K.FNRPETTLFR.S K.TSENAFQSLAGR.T + Oxidation (M) R.LTTVNSFNLPIR.H R.GQLVVVPQNFAIVK.Q K.QAFEDGFVVSFK.T R.SLPIDVVSNIYQISR.E

¹ Numero de banda correspondiente al indicado en las figuras 5B y 6B y especie de amaranto correspondiente; **A. hyb**, *A. hybridus*; **A. pow**, *A. powellii*; **A. cru**, *A. cruentus*; **A. hyp**, *A. hypochondriacus*.² Numero de acceso de acuerdo a NCBI. ³ Peso molecular experimental. ⁴ Peso molecular teórico. ⁵ MASCOT score, iones individuales con valores de score > 35 son estadísticamente significativos ($p < 0.05$). ⁶ Número de péptidos/ Porcentaje de cobertura de la secuencia.

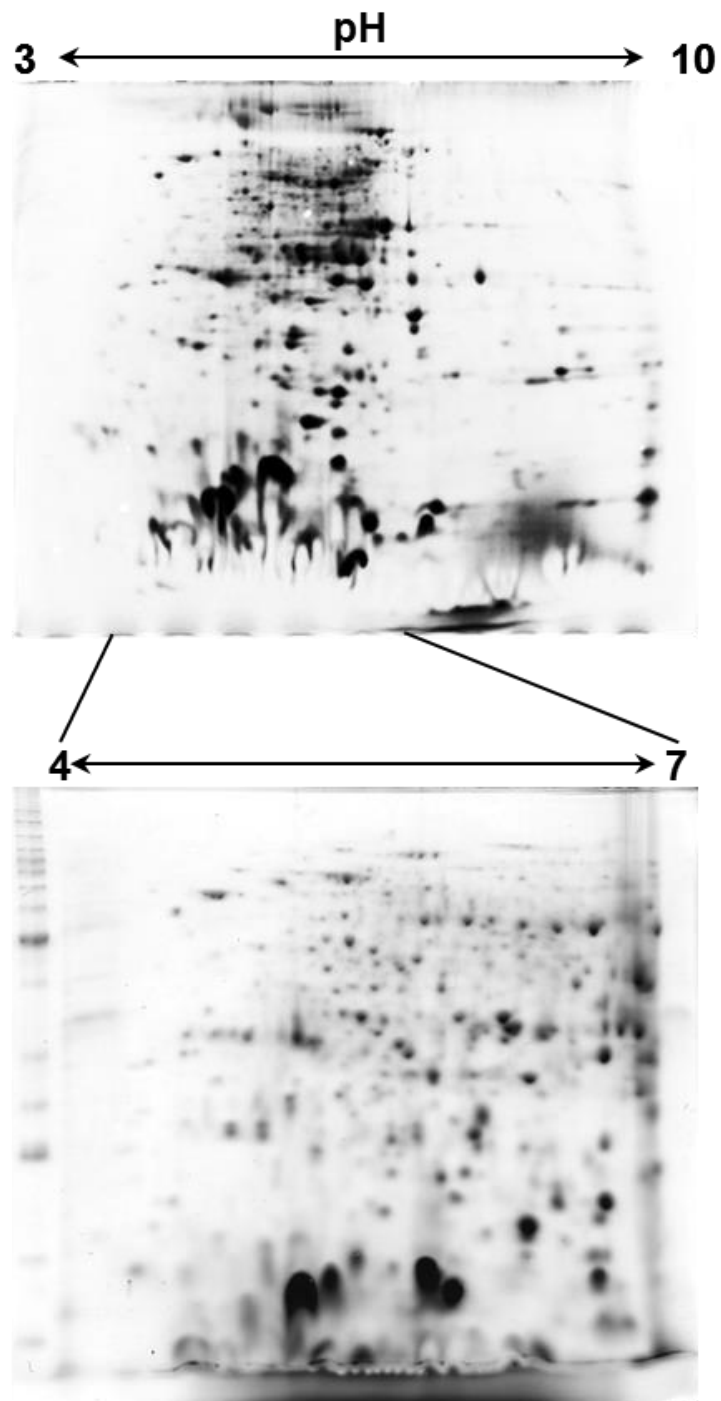


Figura Suplementaria S1. Perfil 2DE de la fracción hidrofílica de *A. powellii* en rangos de pH 3-10 y 4-7.

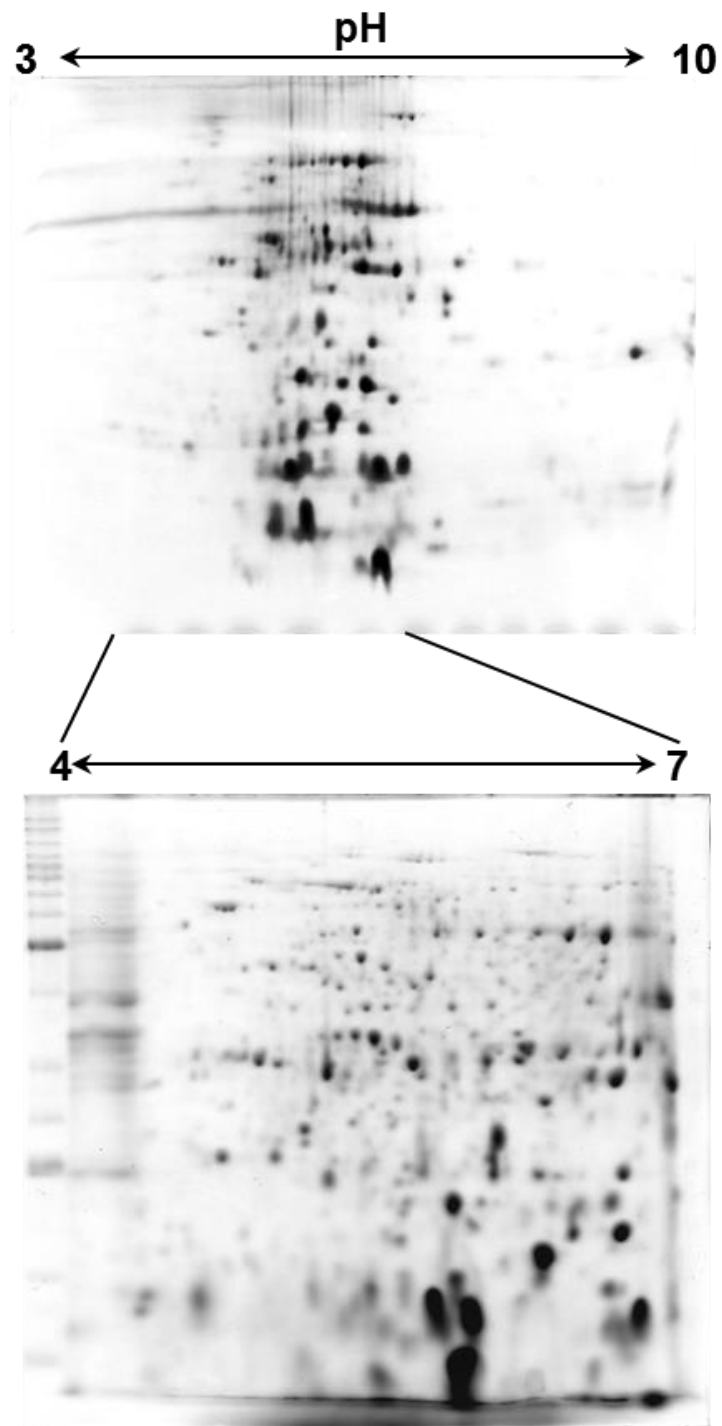


Figura Suplementaria S2. Perfil 2DE de la fracción hidrofílica de *A. cruentus* en rangos de pH 3-10 y 4-7.

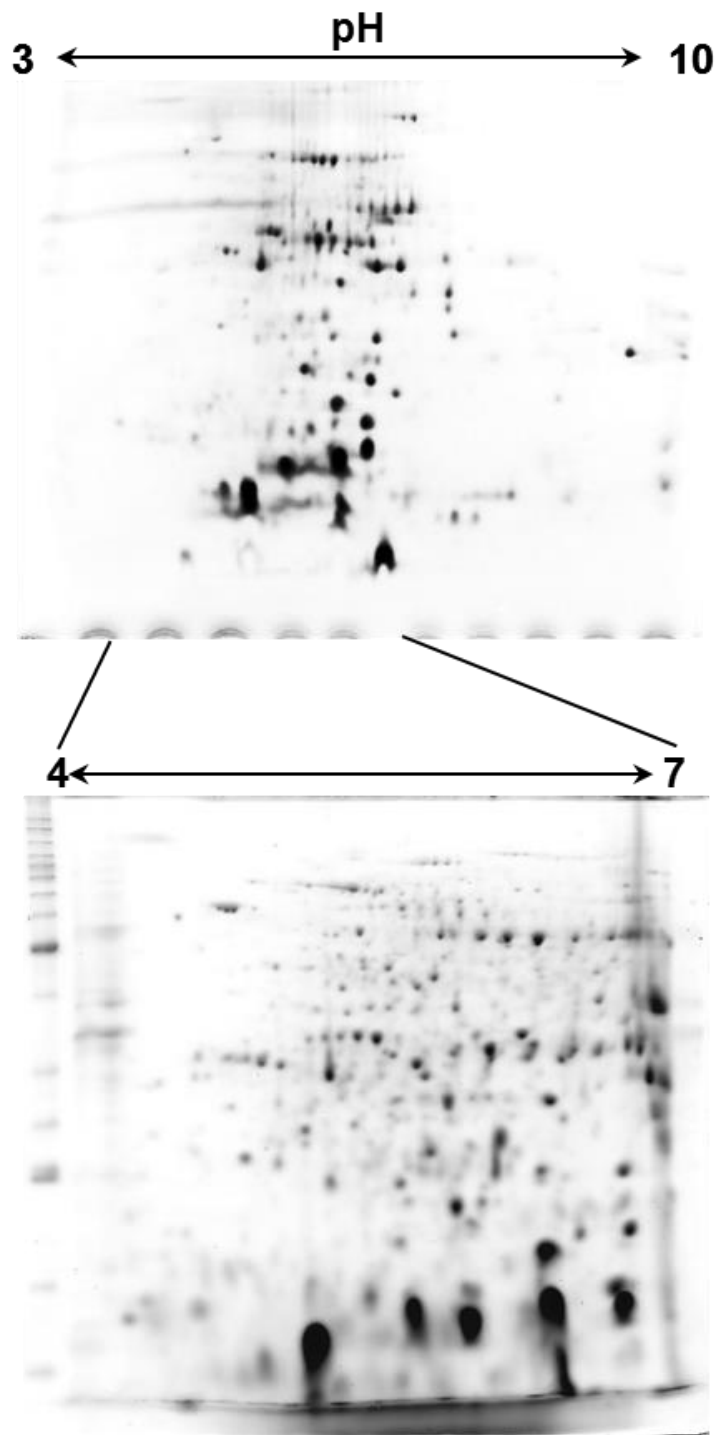


Figura Suplementaria S3. Perfil 2DE de la fracción hidrofílica de *A. hypochondriacus* en rangos de pH 3-10 y 4-7.