

Posición de la vaina en la planta y contenido de compuestos nutraceuticos en grano de frijol*

Seedcase position in the plant and nutraceuticals compounds content in beans grain

Becky E. Torres-García¹, Jorge A. Acosta-Gallegos², María Guadalupe Herrera Hernández², Fidel Guevara-Lara¹ y Salvador Horacio Guzmán-Maldonado^{2§}

¹Universidad Autónoma de Aguascalientes. Avenida Universidad s/n, Aguascalientes, Aguascalientes. Tel. (01 493) 93 5 71 06, 01 800 822 1190 y (449) 910 7444. (betorresg@gmail.com), (fguevara@correo.uaa.mx). ²Campo Experimental Bajío. Carretera Celaya-San Miguel de Allende, km. 6.5. C. P. 38110. Tel. 461 611 5223. Ext. 112, 183 y 128. (jacostagal@gmail.com), (herrera.guadalupe@inifap.gob.mx). [§]Autor para correspondencia: guzman.horacio@inofap.gob.mx.

Resumen

El grano de frijol común es fuente de compuestos con actividad biológica como los taninos condensados, las antocianinas y los fenoles solubles. El frijol presenta una gran variación en el contenido de estos compuestos. El objetivo fue determinar la variación en el contenido de taninos condensados, antocianinas y fenoles solubles en una población masal analizando grupos de semillas obtenidas en diferentes etapas fenológicas definidas por la posición de los nudos y la mezcla de ella proveniente de cinco plantas y cinco posiciones en la planta. Se utilizó la semilla de Negro 8025 y Alubia Chica Zacatecas. Se determinaron los taninos condensados (TC), antocianinas totales (AT) y fenoles solubles (FS). El contenido de estos compuestos se incrementó en la semilla de los nudos conforme subieron en posición en la planta, con excepción de los TC de la variedad Alubia chica. El contenido promedio por planta de los tres compuestos determinados resulto significativamente superior en Negro 8025 en comparación con Alubia Chica (958 vs 57.8 en TC; 114.3 vs 4.2 en AT y 550 vs 278.6 en FS). Se identificaron los intervalos de confianza de los rangos en el contenido de los tres compuestos en las dos variedades para descripción varietal y para estudiar la segregación en progenies derivadas de las variedades estudiadas.

Abstract

Common bean grain is a source of biological active compounds such as condensed tannins the anthocyanins and soluble phenols. Beans present a great variation in the content of these compounds. The objective was to determine the variation in the content of condensed tannins, the anthocyanins and soluble phenols in a mass population through analyzing seeds obtained from different and defined phenological stages by the position of the nodes and its mixture from five plants and five positions in the plant. The seeds of Negro 8025 and Alubia Chica Zacatecas were used. Condensed tannins (CT), total anthocyanins (TA) and soluble phenols (SP) were determined. The content of these compounds was increased in the seed of the nodes according to its higher position in the plant, with the exception of the CT in the variety Alubia Chica. The average content per plant of the three selected compounds resulted in significantly higher compared with Negro 8025 compared to Alubia Chica (958 vs 57.8 in CT; 114.3 vs 4.2 in TA and 550 vs 278.6 in SP). The confidence intervals of the ranges were identified on the content of the three compounds in the varieties for varietal description and to study the segregation in progenies derived from the varieties studied.

* Recibido: marzo de 2012
Aceptado: agosto de 2012

Palabras clave: actividad biológica, fitoquímicos, mejoramiento, nudo de la planta.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una buena fuente de proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales (Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1998). Además, presenta compuestos con actividad biológica como los taninos condensados (TC), antocianinas totales (AT) y fenoles solubles (FS), entre otros (Beninger y Hosfield, 2003). Estos compuestos han sido relacionados con la prevención de enfermedades crónicas (Hangen y Bennink, 2002). Sin embargo, la riqueza en tipos de frijol se ve reflejada en la variación del contenido de TC, AT y FS. Esta variación tiene un efecto biológico importante; por ejemplo, Ríos-Ugalde *et al.* (2007) demostraron en ratas con cáncer de colon, que el alto contenido de taninos condensado en la variedad Flor de Junio Marcela provocó una reducción de 30% en el peso y una sobrevivencia de ratas de 35% en comparación con las variedades Negro 8025 y Pinto Saltillo. En este caso los taninos condensados actuaron como un factor antinutricional. Las variedades Negro 8025 y Pinto Saltillo presentan menor nivel de taninos condensados que FJM y redujeron significativamente el cáncer de colon en ratas. Por lo tanto, es vital que los programas de mejoramiento del frijol generen nuevas variedades que presenten niveles adecuados de fitoquímicos. Sin embargo, los esfuerzos para manipular los fitoquímicos del frijol a través del mejoramiento tradicional o con técnicas biotecnológicas han sido muy escasos (Guzmán-Maldonado *et al.*, 2003).

Para evaluar una característica cuantitativa como es el caso de los TC, AT y FS, es necesario generar poblaciones segregantes obtenidas de cruces de plantas originadas de semillas seleccionadas al azar de la cosecha correspondiente. Tanto los mejoradores tradicionales como los biotecnólogos concuerdan en la necesidad de conocer la concentración exacta del compuesto que se pretende estudiar para identificar progenitores contrastantes. El objetivo del presente trabajo fue determinar la variación en el contenido de taninos condensados, antocianinas totales y fenoles solubles en grupos de semillas obtenidas en diferentes etapas fenológicas definidas por la posición de los nudos y en mezclas de las semillas de estos nodos.

Se utilizaron las variedades Negro 8025 y Alubia Chica Zacatecas de grano blanco. Se tomaron diez semillas de la cosecha de cada variedad y se sembraron bajo riego en 2010 en el Campo Experimental Bajío (INIFAP). De las diez plantas generadas se seleccionaron cinco para tener

Key words: biological activity, phytochemicals, improvement, plant node.

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a good source of protein, carbohydrates, vitamins and minerals (Guzmán-Maldonado and Paredes-López, 1998). It has biological active compounds such as condensed tannins (CT), total anthocyanins (TA) and soluble phenols (SP), among others (Beninger and Hosfield, 2003). These compounds have been linked to the prevention of chronic diseases (Hangen and Bennink, 2002). However, the richness of bean types is reflected in the variation of the content of CT, TA and SP. This variation has a significant biological effect; e.g. Ríos-Ugalde *et al.* (2007) demonstrated in rats with colon cancer that, the condensed tannin content in the Flor de Junio Marcela (FJM) caused a 30% reduction in the weight and 35% survival of rats compared to Negro 8025 and Pinto Saltillo varieties. In this case, the condensed tannins acted as an antinutritional factor. Negro 8025 and Pinto Saltillo had a lower level of condensed tannins, compared to FJM and, significantly reducing colon cancer in the rats. Therefore, it is vital that bean breeding programs generate new varieties which would show an adequate level of phytochemicals. However, efforts to manipulate the bean's phytochemicals through traditional breeding or biotechnology techniques have been rare so far (Guzmán-Maldonado *et al.*, 2003).

In order to evaluate a quantitative characteristic as in the case of CT, TA and SP is necessary to generate segregating populations derived from crosses with plants originating from randomly selected seeds. Both traditional and biotechnologists breeders agree on the need to know the exact concentration of the compound to be studied to identify contrasting parents. The aim of this paper was to determine the variation in the content of condensed tannins, anthocyanins and soluble phenols groups of seeds obtained in different phenological stages defined by the position of the knots and seed mixtures of these nodes.

The varieties used were Negro 8025 and Alubia Chica Zacatecas of white grain. We took ten seeds of each variety and were planted under irrigation in 2010 in the Experimental Bajío Field (INIFAP). Of the ten plants generated five were selected to have replicates (n= 5) and seeds were harvested at different physiological maturity states defined by the position of the nodes on each plant (Table 1).

repeticiones ($n=5$) y se cosechó semillas en estados de madurez fisiológica diferente definidos por la posición de los nudos de cada planta (Cuadro 1).

En consecuencia, NI fue el nudo más viejo localizado en la parte más baja de la planta mientras que N5 fue el nudo más nuevo, localizado en la parte más alta de la planta. Las semillas fueron secadas a la sombra (10-11% H), molidas (Krups Mill, GX100) y almacenadas a -80°C hasta su análisis. Se analizaron las semillas de cada nudo por triplicado de cada una de las cinco plantas por separado. Después del análisis de cada mezcla, el resto de las semillas de cada nudo se mezclaron para ser analizadas tal y como se describe en el Cuadro 1. Los TC se cuantificaron a 500 nm en un espectrofotómetro UV-visible (BioMate™ 3) de acuerdo con Desphande and Cheryan (1985). Se tomo como referencia una curva de (+)catequina para reportar los TC en miligramos equivalentes de (+)catechin por 100 g, base seca (mg E(+)/C/100 g, BS).

Las AT se determinaron con el método de Abdel-Aal y Hucl (2003) a 535 nm y fueron reportadas en miligramos equivalentes de cianidina 3-glucósido por 100 g, base seca (mg EC3G/100 g, BS) tomando como referencia una curva de C3G. Los FS se analizaron por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999) a 735 nm. Las lecturas se compararon con una curva de ácido gálico y se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por 100 g, base seca (mg EAG/100 g, BS). Se realizó un análisis de varianza usando un arreglo factorial A x B (posición), completamente al azar. Las diferencias entre tratamientos fueron determinadas por la comparación de medias (Tukey, $p \leq 0.05$) con el programa SAS (SAS, 2002).

Las diferencias en el contenido de TC, AT y FS entre las dos variedades (Cuadros 2 y 3) analizadas en el presente trabajo los resultados de Caldas y Blair (2009) quienes reportaron que las variedades de frijol con la testa menos pigmentada presentan menores contenidos de compuestos fenólicos. Por ejemplo, los niveles en el contenido de antocianinas del frijol Negro 8025 son similares a Espinosa-Alonso *et al.* (2006) quienes encontraron que las accesiones de frijol silvestre con grano negro presentaron mayor contenido de AT que las de testa crema moteado. Por otro lado, se ha reportado que las variedades de frijol blanco no presentan antocianinas (Lin *et al.*, 2008); sin embargo, en esta investigación se detectaron en la variedad Alubia Chica Zacatecas, aunque en niveles muy bajos.

Cuadro 1. Grupos definidos de semillas de frijol.
Table 1. Defined groups of bean seeds.

| Nudo | Mezclas | |
|------|--------------------------|----------------------------|
| 1 | Grupo 1 (G1) = mezcla | Grupo 3 (G3) = mezcla |
| 2 | de semillas de los nudos | de la semilla de todos los |
| 3 | 1, 2 y 3 | nudos para representar la |
| 4 | Grupo 2 (G2) = mezcla | cosecha masal |
| 5 | de semilla de los nudos | |
| | 4 y 5 | |

Consequently, NI was the oldest node located in the lower part of the plant, while the node N5 was the newest, located in the highest part of the plant. The seeds were dried in the shade (10-11% H), ground (Krups Mill, G X 100) and stored at -80°C until analysis. The seeds were analyzed in triplicate for each node of each of the five plants separately. After the analysis of the mixture, the rest of the seeds from each node to be analyzed were mixed as described in Table 1. The CT is quantitated at 500 nm in a UV-visible spectrophotometer (BioMate™ 3) according to Desphande and Cheryan (1985). As reference, the curve (+) of catechin was taken for reporting CT milligram equivalents (+) of catechin per 100 g, dry basis (mg E (+) C/100 g, BS).

TA was determined by the method of Abdel-Aal and Hucl (2003) at 535 nm and was reported in milligrams equivalents of cyanidin 3-glucoside per 100 g, dry basis (mg EC3G/100 g, BS) by reference to a curve of C3G. SP were analyzed by the Folin-Ciocalteu method (Singleton *et al.*, 1999) at 735 nm. The readings were compared to a curve of gallic acid and expressed in mg of gallic acid equivalents per 100 g, dry basis (mg EAG/100 g, BS). An analysis of variance using a factorial A x B (position), completely random. The differences between treatments were determined by comparison of means (Tukey, $p \leq 0.05$) with SAS software (SAS, 2002).

The differences in the content of CT, TA and SP between the varieties (Tables 2 and 3) analyzed in this paper, the results of Caldas and Blair (2009) who reported that bean varieties with less pigmented testa have lower contents phenolic compounds. For example, levels of anthocyanin content of Negro 8025 beans are similar; Espinosa-Alonso *et al.* (2006) who found that, the accessions of wild beans with black beans had higher TA content than cream-mottled seeds. Furthermore, it has been reported that, the white bean varieties have no anthocyanins

Es importante señalar que si la variedad Negro 8025 y Alubia Chica Zacatecas aquí evaluadas se van a utilizar para realizar cruces con el fin de evaluar la segregación de los compuestos determinados, son dos candidatas idóneas en vista que el contenido de TC, AT y FS entre los nudos y las mezclas de nudos en todos los casos entre las dos variedades fueron estadísticamente diferentes ($p \leq 0.001$). Es decir, en las familias y líneas recombinantes generadas se podrán tomar semillas de cualquier posición de la planta para un análisis.

(Lin *et al.*, 2008), but in this investigation were detected in the variety Alubia Chica Zacatecas, although at very low levels. Importantly, if the variety Negro 8025 and Alubia Chica Zacatecas evaluated here will be used to make crosses to assess the segregation of certain compounds, there are two suitable candidates to view the content of CT, TA and SP between knots and knots' mixtures in all cases between the two varieties were statistically different ($p \leq 0.001$). That is, in families and recombinant lines generated seeds may take any position on the ground for analysis.

Cuadro 2. Contenido de taninos condensados, antocianinas totales y fenoles solubles en la semilla de los nudos y mezcla de estos de la variedad de frijol Negro 8025.

Table 2. Content of condensed tannins, total anthocyanins and soluble phenols in the seeds of the nodes and its combination of Negro 8025 variety.

| Nudo/Grupo | Taninos condensados (mg E(+)/C/100 g) | Antocianinas totales (mg EC3G/100 g) | Fenoles solubles (mg EAG/100 g) |
|------------|--|---|------------------------------------|
| 1 | 880 ± 60 c | 116.3 ± 8.4 a | 486 ± 23 c |
| 2 | 968 ± 43 bc | 94.5 ± 7.8 b | 504 ± 46 abc |
| 3 | 960 ± 48 bc | 95.8 ± 7.9 b | 530 ± 48 abc |
| 4 | 1040 ± 65 b | 106.7 ± 6.3 ab | 513 ± 26 abc |
| 5 | 1340 ± 61 a | 112.3 ± 8.3 a | 550 ± 36 ab |
| G1 | 1065 ± 114 b | 106.5 ± 9.5 ab | 504 ± 30 abc |
| G2 | 958 ± 74 b | 100.0 ± 9.3 ab | 550 ± 27 a |
| G3 | 972 ± 76 b (1037 ± 55) | 114.3 ± 11.9 ab (105.2 ± 7.7) | 489 ± 31 bc (516.6 ± 35.8) |

Promedios con letras iguales en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). En paréntesis se indica el promedio de los cinco nudos. E(+)/C = equivalentes de (+) catequina; EC3G = equivalentes de cianidin 3-glucosido; EAG = equivalentes de ácido gálico.

Cuadro 3. Contenido de taninos condensados, antocianinas totales y fenoles solubles en la semilla de los nudos y mezclas de estos de la variedad frijol blanco Alubia Chica Zacatecas.

Table 3. Content of condensed tannins, total anthocyanidins and soluble phenols in the seed of the knots and mixtures of the variety Alubia Chica Zacatecas.

| Nudo/Grupo | Taninos condensados mg E(+)/C/100 g | Antocianinas mg EC3G/100 g | Fenoles solubles mg EAG/100 g |
|------------|--|-------------------------------|----------------------------------|
| 1 | 48.3 ± 3.9 b | 3.9 ± 0.9 b | 257.0 ± 6.6 b |
| 2 | 51.3 ± 5.0 ab | 4.3 ± 0.4 b | 238.2 ± 10.2 c |
| 3 | 45.2 ± 5.8bc | 4.8 ± 1.1 b | 274.6 ± 8.8 a |
| 4 | 32.6 ± 9.6 cd | 4.9 ± 1.3 b | 268.8 ± 8.5 ab |
| 5 | 29.6 ± 4.4 d | 5.6 ± 1.1 a | 282.5 ± 11.6 a |
| G1 | 54.2 ± 7.4 ab | 4.4 ± 0.7 b | 278.8 ± 11.7 a |
| G2 | 54.2 ± 5.4 ab | 4.2 ± 1.9 b | 264.7 ± 14.2ab |
| G3 | 57.8 ± 3.6 a (41.4 ± 5.7) | 4.2 ± 1.1 b (4.7 ± 1.0) | 278.6 ± 11.5 a (264.2 ± 9.1) |

Promedios con letras iguales en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). En paréntesis se indica el promedio de los cinco nudos en cada compuesto. E(+)/C = equivalentes de (+) catequina; EC3G = equivalentes de cianidin 3-glucosido; EAG = equivalentes de ácido gálico.

El contenido de TC y FS se incrementó en la semilla de los nudos de frijol negro conforme estos subieron en posición en la planta (Cuadro 2). Las vainas del nudo cinco permanecieron menos tiempo en la planta y es probable que la tasa de llenado de la semilla fuera más

The content of CT and SP increased in the seeds of black bean nodes as these rose in position in the plant (Table 2). The pods of the knot five remained less time on the plant and is likely that, the filling-rate of the seed was higher and so accumulating a higher quantity of these compounds. TA

alta y así acumular mayor cantidad de estos compuestos. El contenido de AT no mostró un patrón definido. Se observó una respuesta similar en la semilla de frijol blanco con excepción de los TC cuya concentración fue menor en los nudos más altos de la planta (Cuadro 3). Por otro lado, el contenido de TC, AT y FS del grupo 3 que representa la cosecha masal fue estadísticamente similar al promedio de los cinco nudos -datos en paréntesis en los Cuadros 2 y 3)- en todos los casos con excepción de los TC en el frijol blanco. Se calcularon los intervalos de confianza con el fin de que el mejorador y el biotecnólogo tengan una referencia de los rangos en el contenido de las dos variedades y entre ellas para discriminar líneas segregantes cuyo contenido de TC, AT y FS caiga dentro del rango del intervalo de confianza.

El contenido de compuestos se incrementó en la semilla de los nudos conforme subieron en posición en la planta. El contenido promedio por planta de los tres compuestos determinados resultó significativamente superior en Negro 8025 en comparación con Alubia Chica. Para fines de mejoramiento se debe llevar a cabo el análisis del compuesto fenólico de interés en forma exhaustiva ($n > 90$) con el fin de identificar el nivel de confianza del contenido del compuesto de la semilla que la generó. Este procedimiento se utilizaría para la adecuada elección de progenitores y estudios de herencia y para la identificación de líneas contrastantes

Agradecimientos

Los autores(as) agradecen el apoyo financiero del CONCYTEG (M0007-2007-68967), de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (PIBT-09-8N), del PROMEP-SEP (PTC-076/03.5/08/11265) y de la Fundación Guanajuato Produce (492-08 SIPF 11-2008-0593).

Literatura citada

- Abdel-Aal, E.-S. M. and Hucl, P. 2003. Composition and stability of anthocyanins in blue-grained wheat. *J. Agric. Food Chem.* 51:2174-2180.
- Beninger, C. W. and Hosfield, G. L. 2003. Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 51:7879-7883.

content showed no clear pattern. There was a similar response in the white bean seed except for CT whose concentration was lower in the knots higher in the plant (Table 3). Furthermore, the content of CT, TA and SP in group 3 presented in the masal harvest was statistically similar to the average of the five knots -data in parentheses in Tables 2 and 3)- in all cases except for CT in white beans. The confidence intervals were calculated so that the breeder and biotechnologist would have a reference range of the content in both varieties and between them to discriminate the segregating for the content of CT, TA and SP that would fall within the range of the interval confidence.

The compound content was increased in the seed of the nodes according to its position on the plant itself. The average content per plant of the three selected compounds resulted significantly higher in Negro 8025 compared with Alubia Chica Zacatecas. For breeding purposes, the analysis of the phenolic compound of interest must be made exhaustively ($n > 90$) in order to identify the confidence level of the content of the compound which generated the seeds. This procedure would be used for the proper choice of parents and heritage studies and to identify the contrasting lines (Table 4).

Cuadro 4. Intervalos de confianza (95%) para los TC, AT y FS en dos variedades de frijol.

Table 4. Confidence intervals (95%) for CT, TA and SP in two bean varieties.

| Compuesto fenólico | Negro 8025 | Alubia Chica Zacatecas |
|---|----------------------|------------------------|
| Taninos condensados (mg CE/100 g, DB) | [950 < μ < 1011] | [45 < μ < 51] |
| Antocianinos totales (mg CGE/100 g, DB) | [94 < μ < 1011] | [4 < μ < 5] |
| Fenoles totales solubles (mg GAE/100 g, DB) | [471 < μ < 529] | [264 < μ < 274] |

Para el análisis de los TC de la variedad N8025 se utilizó un número de muestras $n = 120$ y para ACHZAC $n = 102$; para CA, N8025 $n = 96$, ACHZAC $n = 87$; para FS, N8025 $n = 96$, ACHZAC $n = 102$.

End of the English version



- Caldas, G. V. and Blair, M. W. 2009. Inheritance of seed condensed tannins and their relationship with seed-coat color and pattern genes in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theory Apply Genetic.* 119:131-142.

- Deshpande, S. S. and Cheryan, M. 1985. Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry beans. *J. Agric. Food Chem.* 50: 906-910.
- Espinosa-Alonso, L. G.; Lygin, A.; Widholm, J. M.; Valverde, M. E. and Paredes-López, O. 2006. Polyphenols in wild and weedy mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 54: 4436-4444.
- Guzmán-Maldonado, S. H. and Paredes-López, O. 1998. Functional properties of plants indigenous to Latin America-Amaranth, Quinoa, Common Beans and other botanicals. En *Processing and Evaluation of Functional Foods*. G. J. Mazza, ed., Technomic Publishing Co., Inc.: Lancaster, PA. 293-328 pp.
- Guzmán-Maldonado, S. H.; Martínez, O.; Acosta-Gallegos, J. and Paredes-López, O. 2003. Putative quantitative trait loci for some physical and chemical components of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Crop Sci.* 43:1029-1035.
- Hangen, L. and Bennink, M. R. 2002. Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymetnane-induced colon cancer in rats. *Nutr. Cancer* 44(1):60-65.
- Ríos-Ugalde, C.; Reynoso, R.; Torres-Pacheco, I.; Acosta-Gallegos, J. A.; Palomino-Salinas, J.; Ramos-Gómez, M.; González-Jasso E. y Guzmán-Maldonado, S. H. 2007. Efecto del consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre el cáncer de colon en ratas Sprague-Dawley. *Agric. Tec. Méx.* 33:43-52.
- Singleton, V. L.; Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299:152-178.