



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**RELACIÓN ENTRE LA DEGRADACIÓN
ENZIMÁTICA DE SACAROSA Y LA MADURACIÓN
DE SEMILLAS DE FRIJOL BAJO CONDICIONES
AMBIENTALES ADVERSAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

CRISTIAN ALBERTO VERGARA GERÓNIMO



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2016**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno	1. Datos del alumno
Apellido paterno	Vergara
Apellido materno	Gerónimo
Nombre(s)	Cristian Alberto
Teléfono	55 16 54 41 91
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de Cuenta	308327731
2. Datos del tutor	2. Datos del tutor
Grado	Dr.
Nombre(s)	Eleazar
Apellido paterno	Martínez
Apellido materno	Barajas
3. Datos del sinodal 1	3. Datos del sinodal 1
Grado	Dr.
Nombre(s)	Javier Andrés
Apellido paterno	Juárez
Apellido materno	Díaz
4. Datos del sinodal 2	4. Datos del sinodal 2
Grado	Dra.
Nombre(s)	Helia Reyna
Apellido paterno	Osuna
Apellido materno	Fernández
5. Datos del sinodal 3	5. Datos del sinodal 3
Grado	Dr.
Nombre(s)	Sol
Apellido paterno	Cristians
Apellido materno	Niizawa
6. Datos del sinodal 4	6. Datos del sinodal 4
Grado	Dra.
Nombre(s)	Edén Marcela
Apellido paterno	Rodríguez
Apellido materno	Flores
7. Datos del trabajo escrito	7. Datos del trabajo escrito
Título	Relación entre la degradación enzimática de sacarosa y la maduración de semillas de frijol bajo condiciones ambientales adversas
Número de páginas	48 p.
Año	2016

Índice

Índice	- 3 -
Reconocimientos	- 5 -
Agradecimientos	- 6 -
Abreviaturas	- 7 -
Resumen.....	- 8 -
1. Introducción	- 9 -
1.1. Características generales de la planta del frijol.....	- 9 -
1.2. Desarrollo de las semillas de las leguminosas	- 10 -
1.3. Nutrición de las semillas	- 11 -
1.4. Sacarosa sintasa.....	- 12 -
1.5. Invertasa neutra	- 13 -
1.6. Importancia del frijol.....	- 14 -
1.7. Efecto de las condiciones ambientales adversas en la producción de frijol	- 16 -
1.8. Movilización de reservas nutricionales hacia las semillas	- 17 -
1.9. El mejoramiento del frijol frente a las condiciones ambientales adversas	- 18 -
2. Justificación	- 19 -
3. Hipótesis	- 20 -
4. Objetivos	- 21 -
4.1. Objetivo general	- 21 -
4.2. Objetivos específicos.....	- 21 -
5. Materiales y métodos	- 22 -
5.1. Cultivo de plantas de frijol Canario 60 y muestreo de embriones y vainas.....	- 22 -
5.2. Registro del peso seco de frutos	- 23 -
5.3. Preparación de extractos de proteína para análisis enzimáticos	- 23 -

5.4. Ensayos de actividad enzimática	- 24 -
5.5. Cuantificación de proteína.....	- 25 -
5.6. Análisis estadístico	- 25 -
6. Resultados	- 26 -
6.1. Degradación enzimática de sacarosa en frutos removidos de la planta	- 26 -
6.2. Degradación enzimática de sacarosa en frutos de plantas sometidas a sequía	- 28 -
6.3. La fuerza de demanda en relación a las condiciones ambientales	- 30 -
6.4. Efecto de las condiciones ambientales adversas sobre el peso seco de las semillas	- 32 -
7. Discusión.....	- 36 -
7.1. La degradación enzimática de sacarosa aumenta durante la maduración de las semillas de frijol	- 36 -
7.2. La movilización de reservas en la vaina es deficiente en la variedad Canario 60	- 37 -
7.3. Las semillas tienen un crecimiento menor bajo sequía	- 39 -
7.4. Posibles blancos para aumentar el rendimiento de los cultivos de frijol Canario 60.....	- 39 -
8. Conclusiones	- 41 -
9. Literatura citada	- 42 -

Agradecimientos

Al Dr. Eleazar Martínez Barajas por aceptarme en su grupo de trabajo, por su apoyo, instrucción y consejos que permitieron la realización de esta tesis. Mi estancia en el laboratorio fue una experiencia invaluable pues me volví consciente de todo lo que involucra el trabajo en el laboratorio de investigación.

A los sinodales de esta tesis: Dr. Javier Andrés Juárez Díaz, Dra. Helia Rayna Osuna Fernández, Dr. Sol Cristians Niizawa y Dra. Edén Marcela Rodríguez Flores. Su punto de vista crítico y sus comentarios a este trabajo enriquecieron mucho este escrito.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser tan buena, por su calidad y por abrirme sus puertas desde el inicio del bachillerato en la ENP 1.

A la Facultad de Ciencias, que ha sido mi segundo hogar desde que inicié la licenciatura, donde he aprendido tanto junto a compañeros y profesores, y gracias a la cual he logrado enamorarme aún más de la Biología.

A mis hermanos Miguel, Ulises y Andrés, que con su apoyo y compañía siempre hacen de los días una experiencia genial y muy divertida.

Y al final, pero los más importantes, a mis padres, Andrés Vergara Hernández y Emma Gerónimo Bermejo, que me han apoyado en todo sentido durante estos años en la realización de mi licenciatura. Este trabajo está dedicado a ustedes y les agradezco todo el amor y el aliento que siempre me han dado para cumplir mis sueños y que ahora me han permitido concluir la licenciatura.

Sf

Abreviaturas

ATP – Adenosina trifosfato

BSA – Albúmina sérica bovina

CDPK – Cinasa dependiente de Ca^{+2}

DDF – Días después de la floración

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido etilendiamino tetraacético

EGTA – Ácido etileno glicol-bis(β -aminoetil eter) tetraacético

HEPES – Ácido hidroxietil piperazin etanosulfónico

HXK1 – Hexocinasa 1

INV-CW – Invertasa ácida asociada a la pared celular

INV-V – Invertasa ácida vacuolar

MOPS-KOH – Ácido 3-morfolino propanosulfónico

NADH – Nicotinamida adenina dinucleótido

PMSF – Fluoruro de fenilmetilsulfonio

PVP - Polivinilpirrolidona

SnRK – sucrose non-fermenting related kinase

U – Unidades de actividad enzimática

UDP – Uridina difosfato

UDP-Glc – uridina difosfato glucosa

Resumen

El frijol es la leguminosa más ampliamente cultivada a nivel mundial y su consumo representa la principal fuente de proteína en amplios sectores de la población mexicana. Sin embargo, el cultivo de frijol es, en muchos aspectos, una actividad marginal a la que no se destinan los recursos necesarios para incrementar su productividad. Esto aumenta su vulnerabilidad a las condiciones ambientales adversas, siendo la sequía el factor principal que reduce su rendimiento, pues ocasiona la pérdida del 50 al 100% de la producción potencial y arriesga estructuras socioeconómicas y culturales que dependen de este cultivo.

La sacarosa sintasa y la invertasa neutra son enzimas que participan en la síntesis de sustancias de reserva durante la maduración de las semillas de las leguminosas y podrían relacionarse con la productividad de los cultivos de frijol bajo condiciones ambientales adversas. En este trabajo se reporta el análisis de las actividades enzimáticas de la sacarosa sintasa y de la invertasa neutra en los frutos de frijol Canario 60 durante la maduración de las semillas, en condiciones normales y bajo estrés ambiental por la remoción de los frutos o por la eliminación del riego de la planta.

Se encontró que las actividades de ambas enzimas facilitan la maduración de las semillas al favorecer la síntesis de sustancias de reserva y el transporte eficiente de nutrientes hacia los frutos, tanto en condiciones ambientales normales como adversas. También se determinó que la vaina no es una fuente de nutrientes importante durante la maduración de las semillas para el genotipo Canario 60.

1. Introducción

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una planta perteneciente a la familia Fabaceae o de las leguminosas. Se originó en Mesoamérica hace cerca de 2 millones de años en el contexto geológico de la formación de la Faja Volcánica Transmexicana (Delgado-Salinas et al. 2006). Fue domesticado en las regiones andina y mesoamericana hace aproximadamente 8 mil años (Schmutz et al. 2014). Actualmente, se cultiva en todo el mundo para el consumo humano de las semillas maduras y, en menor medida, de las vainas tiernas conocidas en México como ejotes (Bellon et al. 2009; Graham & Ranalli 1997).

1.1. Características generales de la planta del frijol

El frijol es una planta herbácea, anual y de crecimiento determinado o indeterminado. En su sistema radicular se encuentran los nódulos de fijación de nitrógeno y los pelos radiculares, estructuras importantes para la absorción de agua y la nutrición mineral. En la parte aérea se distingue el tallo, que posee internodos y nodos en los cuales se desarrollan las hojas. El tallo es ramificado y las flores crecen sobre éste en posición axilar a las hojas (Graham & Ranalli 1997; Nassar et al. 2010).

Las flores del frijol son papilionáceas y, tras la fecundación, el ovario genera un fruto del tipo legumbre (Figura 1.1A), formada por la vaina en cuyo interior se desarrollan las semillas (Nassar et al. 2010). Las semillas maduras, que poseen solo el embrión y la cubierta, presentan diversos tamaños, colores y formas, según el genotipo o la población silvestre a la que pertenecen (Graham & Ranalli 1997), como se ejemplifica con algunas variedades en la Figura 1.1B.



Figura 1.1. A) Sección longitudinal de un fruto de frijol (flecha=vaina; estrella=semilla). Tomada de Coello & Martínez-Barajas (2016). B) Forma, tamaño y color de las semillas de algunos genotipos de frijol. Tomada de Schmutz et al. (2014), MA: mesoamericano.

1.2. Desarrollo de las semillas de las leguminosas

El desarrollo de las semillas de las leguminosas, como el frijol, puede dividirse en dos fases, la de división celular y la de maduración. En la fase de división, se distinguen morfológicamente en la semilla: la cubierta, el endospermo y el embrión. En esta etapa, la cubierta controla el desarrollo de la semilla, pues su actividad elevada de invertasa ácida asociada a la pared celular (INV-CW) genera altas concentraciones de glucosa y de fructosa que estimulan el crecimiento del embrión por división celular (Weber et al. 2005).

En la fase de maduración, el endospermo degenera y la división celular embrionaria cesa. También la testa reduce su actividad de INV-CW, lo que contribuye a elevar la concentración de sacarosa en el medio localizado entre el embrión y la testa. El embrión toma el control del desarrollo de la semilla en esta etapa, pues su epidermis se diferencia en un tejido muy eficiente en el transporte de la sacarosa que se encuentra en el medio externo, cuya actividad incrementa la concentración de sacarosa en el interior del embrión. Simultáneamente, aumentan las actividades enzimáticas de sacarosa sintasa e invertasa neutra embrionarias. Estas dos enzimas están relacionadas con el crecimiento del embrión

por medio de expansión celular y de la síntesis masiva de sustancias de reserva (almidón, proteínas, lípidos) durante la fase de maduración (Weber et al. 2005; Ross et al. 1996; Déjardin et al. 1997; Polit & Ciereszko 2012).

1.3. Nutrición de las semillas

Las semillas son estructuras heterotróficas, cuyo desarrollo depende en gran medida de los nutrientes proporcionados por la planta (Weber et al. 2005; Schiltz et al. 2004; Yang et al. 2004). El flujo de nutrientes que sostiene el desarrollo de las semillas obedece la diferencia de la concentración de sacarosa y de la presión hidrostática en el floema entre los órganos fuente (hojas, tallos, etc.) y las semillas. Los nutrientes se transportan desde los órganos fuente hacia las semillas porque los primeros tienen una mayor presión hidrostática y una mayor concentración de sacarosa que en las semillas (Minchin & Lacombe 2005).

La fuerza de demanda es la capacidad que tiene un tejido para metabolizar sacarosa en un momento dado, y establece la prioridad de los distintos órganos para la distribución de los nutrientes disponibles en la planta, pues reduce la concentración de sacarosa y la presión hidrostática en el floema adyacente. La fuerza de demanda depende principalmente de la degradación enzimática de sacarosa por parte de la INV-CW, de la invertasa vacuolar (INV-V), de la invertasa neutra, de la sacarosa sintasa y de la actividad de los transportadores transmembranales de sacarosa que, si bien no degradan sacarosa, son capaces de disminuir su concentración en el floema. Debido a la naturaleza del flujo de nutrientes en la planta, descrito en el párrafo anterior, los tejidos con mayor fuerza de demanda reciben una mayor parte de los nutrientes generados en las hojas (Minchin & Lacombe 2005).

Las semillas en la fase de maduración son estructuras con alta prioridad para la distribución de sacarosa, cuya fuerza de demanda se determina con base en la actividad de los transportadores de sacarosa, localizados en la epidermis embrionaria, y las actividades de

la sacarosa sintasa y de la invertasa neutra, enzimas involucradas en el uso metabólico de la sacarosa que ingresa a las células del embrión (Minchin & Lacoite 2005; Weber et al. 2005; Ross et al. 1996; Déjardin et al. 1997).

1.4. Sacarosa sintasa

La sacarosa sintasa es una enzima con actividad de glicosiltransferasa codificada por una familia multigénica. Se sintetiza como un polipéptido de 92 kDa y su estructura funcional es en tetrámeros (Silvente et al. 2003). Cataliza la degradación reversible de sacarosa usando UDP y produce UDP- glucosa (UDP-Glc) y fructosa (Figura 1.2). La dirección de la reacción depende de la disponibilidad de los sustratos y de la remoción de los productos. Sin embargo, su principal función *in vivo* es la degradación de sacarosa en tejidos heterotróficos (Baroja-Fernández et al. 2003).

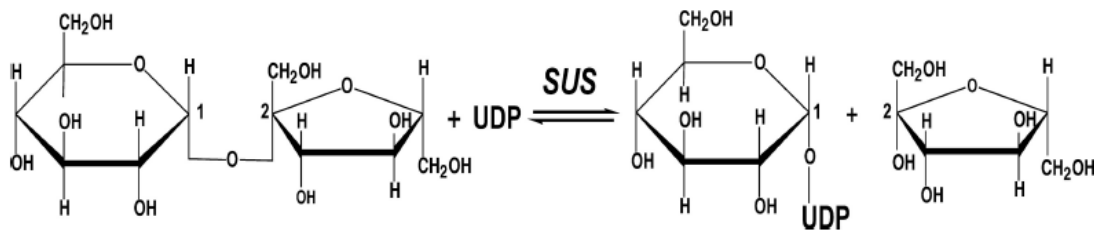


Figura 1.2. La sacarosa sintasa (SUS) cataliza la degradación reversible de sacarosa a UDP-Glc y fructosa usando UDP. Tomada de Zheng et al. (2011).

Inicialmente, la sacarosa sintasa se describió como una enzima citosólica, pero recientemente se ha localizado en el interior del núcleo, en la matriz mitocondrial y en el estroma de los plastidios, donde se presume que tiene funciones catalíticas y de regulación relacionadas con la síntesis de almidón y el metabolismo energético (Subbaiah et al. 2006; Hennen-Bierwagen et al. 2009).

La regulación de su actividad enzimática es compleja y se lleva a cabo a través de mecanismos que operan a nivel transcripcional y postraducciona. A nivel de la transcripción, las rutas de señalización dependientes de la hexocinasa 1 (HXK1) y de la SnRK1 estimulan la expresión del gen que codifica la sacarosa sintasa (Purcell et al. 1998; Ciereszko & Kleczkowski 2002). En cuanto al nivel postraducciona, Huber et al. (1996) determinaron que las isoformas de la sacarosa sintasa Sh1 y Sus1, presentes en el maíz (*Zea mays*), pueden fosforilarse reversiblemente en el residuo Ser15, lo que contribuye a aumentar su actividad de degradación de sacarosa. Las cinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs) y SnRK1 pueden realizar esta fosforilación (Huber et al. 1996; Asano et al. 2002; Hardin et al. 2003) y este residuo de Ser está conservado en las isoformas de la sacarosa sintasa del frijol (Silvente et al. 2003).

La sacarosa sintasa es una enzima esencial durante el desarrollo embrionario (Abid et al. 2009) y su actividad es alta en las semillas y otros tejidos heterotróficos, donde participa en la síntesis de sustancias de reserva (Baroja-Fernández et al. 2003; Núñez et al. 2008; Déjardin et al. 1997; Asano et al. 2002; Ross et al. 1996; Yang et al. 2004). Debido a que la productividad de muchos cultivos depende de un elevado contenido de sustancias de reserva en las semillas, la regulación de la actividad de la sacarosa sintasa puede contribuir a generar cultivos más eficientes (Jiang et al. 2011).

1.5. Invertasa neutra

La invertasa neutra es una enzima de 65 kDa, codificada por una familia multigénica y cuya estructura funcional es en tetrámeros. Hidroliza sacarosa en glucosa y fructosa con actividad óptima a pH 6.8-8, y los productos son los principales inhibidores de la reacción (den Ende & Van Laere 1993; Yao et al. 2009). Debido a esto, los principales mecanismos de regulación de la actividad enzimática de la invertasa neutra son el control de la cantidad

de la enzima, de la concentración de hexosas y del pH (den Ende & Van Laere 1993). Sin embargo, las CDPKs y la SnRK2 pueden fosforilar a la invertasa neutra, lo que aumenta la actividad hidrolasa de esta enzima (Gao et al. 2014).

La hidrólisis de sacarosa mediada por la actividad de la invertasa neutra contribuye con la generación de las concentraciones moleculares de glucosa y fructosa que son necesarias para sostener procesos energéticamente demandantes, entre los que se incluye la acumulación masiva de reservas que ocurre durante la fase de maduración de las semillas de las leguminosas (Ross et al. 1996; Vargas et al. 2008).

Al igual que la sacarosa sintasa, la invertasa neutra era descrita como una enzima exclusivamente citosólica. Sin embargo, recientemente se estableció que puede asociarse al núcleo y localizarse en la matriz mitocondrial y en el estroma de los plastidios. Se presume que, además de su función catalítica, la invertasa neutra participa en la regulación de diversos procesos como son la síntesis de almidón, el acoplamiento de la glucólisis con la fosforilación oxidativa, y la regulación de la expresión genética (Lou et al. 2007; Murayama & Handa 2007).

1.6. Importancia del frijol

El frijol es la leguminosa más ampliamente cultivada, con más de 30 millones de Ha distribuidas en regiones tropicales, subtropicales y templadas (Food and Agriculture Organization [FAO], 2016; Graham & Ranalli, 1997). Su producción mundial en 2014 fue de 25 millones de toneladas, con rendimiento promedio de 832.6 kg/Ha (FAO, 2016).

Su relevancia agrícola se debe a la riqueza nutricional de las semillas, principalmente su elevado contenido de proteína, el cual supera el 20% del peso seco y cuyo consumo en muchos lugares proporciona cerca del 40% de la ingesta diaria recomendada. Las semillas

de frijol también contienen cantidades importantes de almidón, fibra, calcio, hierro, tiamina, riboflavina y niacina (Sangerman-Jarquín et al. 2010).

En México, centro de origen y de domesticación del frijol, es un cultivo estratégico que posee riqueza genética amplia y un elevado número de variedades domésticas (Bellon et al. 2009; Schmutz et al. 2014). Esta diversidad de cultivos ha formado parte de la dieta básica de la población desde tiempos antiguos. Actualmente, constituye la principal fuente de proteína para una gran parte de la población, particularmente la población marginada, pero también contribuye a una nutrición adecuada en todos los niveles socioeconómicos (Sangerman-Jarquín et al. 2010; Bellon et al. 2009).

Entre las muchas variedades cultivadas, el frijol Canario tiene una elevada preferencia del consumidor, particularmente en el mercado del centro de México, y su demanda y atractivo comercial la han hecho una de las principales por superficie cosechada (Sangerman-Jarquín et al., 2010; Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación [SAGARPA], 2006).

La producción de frijol de México fue la quinta a nivel mundial en 2014 (Figura 1.3). Tiene un valor estimado en 11 millardos de pesos, proporciona una fuente de ingreso y autoconsumo para los cerca de 500 mil productores y genera más de 300 mil empleos permanentes (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2015 [INEGI]; SAGARPA, 2006). A pesar de su importancia, la producción de frijol se ha mantenido estancada en ~1.1 millones de toneladas durante los últimos 35 años (Cuadro 1.1), debido a que se cultiva bajo condiciones ambientales adversas y porque los programas gubernamentales de apoyo a los productores son insuficientes y poco efectivos (FAO, 2016; Sangerman-Jarquín et al., 2010).

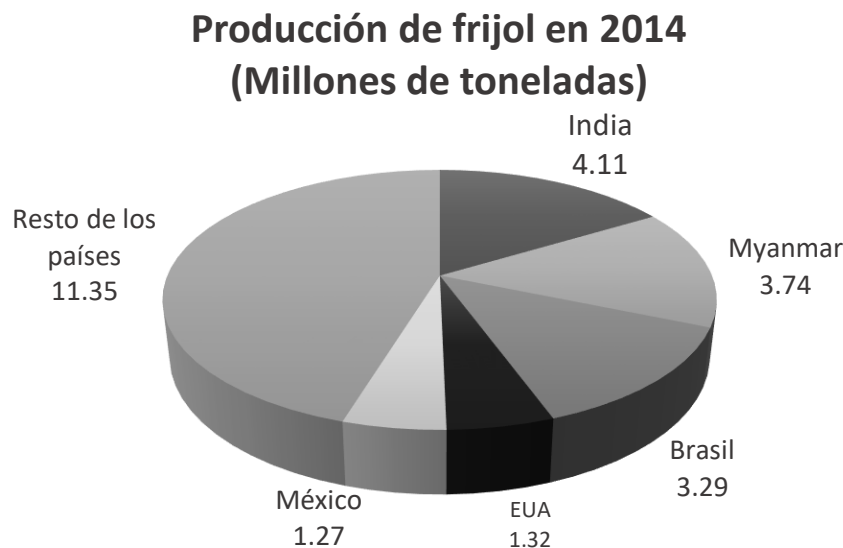


Figura 1.3. México figuró entre los principales países productores de frijol del año 2014 (Elaborado con datos de la FAO).

1.7. Efecto de las condiciones ambientales adversas en la producción de frijol

La baja fertilidad del suelo, característica de muchas de las tierras dedicadas al cultivo del frijol, es un factor que disminuye la producción potencial de este cultivo porque reduce la disponibilidad de nutrientes destinados a sostener el desarrollo de las semillas. Por ejemplo, se ha demostrado en plantas modelo que la falta de nitrógeno o de fósforo hace que el crecimiento de las raíces se favorezca sobre el desarrollo de las semillas, mientras que la escasez de magnesio o de potasio afecta el transporte de sacarosa desde las hojas hacia las semillas (Lemoine et al. 2013).

Si bien el efecto negativo de la escasa fertilidad de los suelos es muy importante, la sequía es el factor que más disminuye el rendimiento de los cultivos. Esta condición reduce la capacidad fotosintética, la síntesis de sacarosa y el transporte de nutrientes a lo largo del floema (Rosales et al. 2012; Lemoine et al. 2013; Acosta-Díaz et al. 2009; Barrios Gómez et al. 2011; Graham & Ranalli 1997).

Cuadro 1.1. La producción de frijol en México durante los últimos 35 años (promedio \pm desviación estándar). (Elaborado con datos de la FAO).

Producción anual Ton	Área cultivada Ha	Rendimiento Kg/Ha
1, 105, 792 \pm 235, 715	1, 709, 623 \pm 289, 342	647.1 \pm 89.8

Este déficit nutricional, generado por la sequía, reduce la fertilidad de la planta y el período de maduración de las semillas, por lo que la planta genera menos frutos que, además, tienen menos semillas. El tamaño de las semillas también se reduce como consecuencia del acortamiento del tiempo disponible para acumular sustancias de reserva (Acosta-Díaz et al. 2009; Graham & Ranalli 1997; Yang et al. 2004; Cuellar-Ortiz et al. 2008).

A nivel mundial, la mayor parte de la tierra sembrada con frijol está sometida a la reducción del rendimiento por sequía (Graham & Ranalli 1997). En el caso de México, el 90% de la superficie sembrada con frijol no tiene riego y, por causa de las lluvias erráticas o insuficientes, se presentan pérdidas que pueden ir del 50 al 100% de la producción potencial (Barrios Gómez et al. 2011; Sangerman-Jarquín et al. 2010; Padilla-Bernal et al. 2012).

1.8. Movilización de reservas nutricionales hacia las semillas

La elevada demanda nutricional de las semillas de leguminosas en desarrollo induce la degradación de sustancias de reserva (almidón, proteínas, lípidos y pared celular) presentes en los tejidos vegetativos, aun cuando la planta se encuentra en condiciones favorables (Schiltz et al. 2004; Yang et al. 2004; Cuellar-Ortiz et al. 2008). Este proceso permite que una parte importante de los materiales acumulados en estas estructuras sean reciclados y se conviertan en nutrientes que pueden ser transportados hacia las semillas, las estructuras con la mayor fuerza de demanda (Minchin & Lacoite 2005).

Este fenómeno, resumido como la “movilización” de reservas, es más evidente y se vuelve más importante para el sostenimiento del desarrollo de las semillas cuando las plantas se encuentran en condiciones ambientales adversas. En *A. thaliana* y el arroz (*Oryza sativa*) se ha observado que la sequía ocasiona un déficit nutricional que reduce el nivel de sacarosa disponible para la nutrición de las semillas. Esto promueve la degradación de sustancias de reserva en los tejidos vegetativos y la transferencia de los nutrientes generados hacia las semillas, lo que favorece la culminación del desarrollo de una parte importante de éstas (Yang et al. 2004; Lee et al. 2004).

Se ha reportado que la movilización de reservas durante el déficit hídrico también ocurre en el frijol y que es tan importante que permite que el desarrollo de las semillas continúe, lo que agronómicamente contribuye a mejorar el rendimiento de los cultivos de frijol que se desarrollan en estas condiciones (Cuellar-Ortiz et al. 2008; Rosales et al. 2012; Acosta-Díaz et al. 2009; Coello & Martínez-Barajas 2016).

1.9. El mejoramiento del frijol frente a las condiciones ambientales adversas

México tiene un elevado potencial para aumentar la productividad del cultivo de frijol mediante el uso en programas de fitomejoramiento de la amplia riqueza genética presente en las poblaciones silvestres (Bellon et al. 2009; Sangerman-Jarquín et al. 2010; Schmutz et al. 2014). Los resultados de estos programas pueden ser mayores en la medida de que incorporen el conocimiento sobre las respuestas fisiológicas de las plantas a las condiciones no óptimas. Una contribución importante a este conocimiento podría ser el establecimiento de las funciones en las que están involucradas la sacarosa sintasa y la invertasa neutra de los frutos de frijol que se desarrollan bajo estrés ambiental, debido a la relevancia de estas enzimas en el proceso de maduración de las semillas en condiciones óptimas.

2. Justificación

Ante la severidad de los efectos negativos de la sequía y de otras condiciones adversas sobre la productividad del cultivo de frijol en México, se requiere entender los mecanismos fisiológicos que podrían contribuir a mejorar la capacidad productiva de las plantas de frijol cultivadas en ambientes hostiles y usar los conocimientos generados en programas de mejoramiento.

Las actividades de la sacarosa sintasa y de la invertasa neutra contribuyen favorablemente a la maduración de las semillas (Déjardin et al. 1997; Núñez et al. 2008; Polit & Ciereszko 2012; Ross et al. 1996; Vargas et al. 2008; Cuellar-Ortiz et al. 2008; Jiang et al. 2011). Dado que se presume que las actividades elevadas de ambas enzimas podrían acelerar la maduración de las semillas e incrementar la movilización de las reservas acumuladas en las estructuras vegetativas de la planta de frijol, en este trabajo se analizaron las actividades de ambas enzimas en dos modelos experimentales que limitan la disponibilidad de nutrientes para el desarrollo de las semillas. El primer modelo consistió en remover los frutos de la planta cuando las semillas inician la acumulación de sustancias de reserva, mientras que en el segundo modelo se analizaron frutos de plantas sometidas a sequía. Los resultados obtenidos proporcionan información acerca de los fenómenos fisiológicos y bioquímicos involucrados en la maduración exitosa de las semillas cuando existe una limitación nutricional causada por estrés ambiental.

3. Hipótesis

En respuesta al déficit nutricional generado por condiciones ambientales adversas, las actividades de la sacarosa sintasa y de la invertasa neutra se incrementarán en las vainas de los frutos y en los embriones de las semillas de frijol. Esto favorecerá la maduración de las semillas por medio de una mayor biosíntesis de sustancias de reserva en las semillas y de la movilización de los nutrientes presentes en la vaina del fruto.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Analizar las actividades de la sacarosa sintasa y de la invertasa neutra y su relación con la maduración de las semillas y la movilización de las reservas presentes en la vaina, en frutos de frijol Canario 60 sometidos a estrés ambiental.

4.2. Objetivos específicos

- Comparar las actividades de sacarosa sintasa e invertasa neutra en embriones y vainas de frijol Canario 60 durante el proceso normal de la maduración de las semillas y en condiciones de limitación nutricional generadas por la remoción de los frutos o la imposición de sequía en la planta.
- Evaluar el efecto de la limitación de nutrientes sobre el peso seco en semillas y vainas de frijol Canario 60 durante la fase de maduración de las semillas.
- Discutir la relación que pudiera existir entre el desarrollo de las semillas y la movilización de reservas acumuladas en la vaina con las actividades de sacarosa sintasa e invertasa neutra cuando los frutos se desarrollan bajo condiciones ambientales que limitan la disponibilidad de nutrientes.

5. Materiales y métodos

5.1. Cultivo de plantas de frijol Canario 60 y muestreo de embriones y vainas

Se cultivaron plantas de frijol Canario 60 en el invernadero de la Facultad de Química, UNAM, con un fotoperiodo de 16 h luz a 25°C/ 8 h oscuridad a 16°C. Se usaron macetas de 3 L con agrolita que fueron regadas diariamente con solución Hoagland (KNO_3 3 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 2 mM, MgSO_4 1 mM, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 3mM, MnCl_2 4 μM , H_3BO_3 23 μM , ZnSO_4 4 μM , CuSO_4 0.15 μM , H_2MoO_4 0.05 μM y 5 g l⁻¹ de EDTAFe). Las flores se rotularon en la fecha de floración para determinar la edad de los frutos. En todos los muestreos realizados solamente se usaron frutos cuya apariencia sugería que su desarrollo había sido el óptimo, esto es, frutos que tenían vainas rectas con la mayor longitud posible, alrededor de 10 cm (Figura 5.1A), y tres o más semillas desarrollándose en su interior (Figura 5.1B).

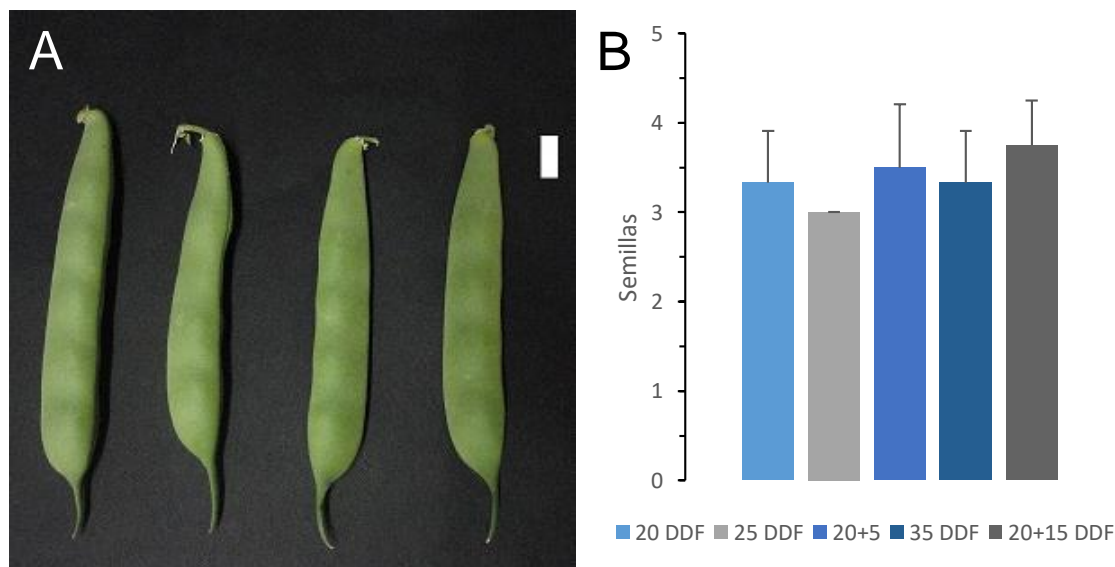


Figura 5.1. A) Apariencia general de los frutos que se usaron para la medición de la actividad enzimática y del peso seco de las semillas y de las vainas (escala=1 cm). B) El número de semillas presentes en los frutos que se utilizaron fue similar en todos los muestreos.

Para analizar el efecto de la limitación de nutrientes en los frutos durante la maduración de las semillas, éstos se removieron de la planta a los 20 días después de la floración (DDF) y se incubaron en oscuridad a 25°C. Se tomaron muestras de embrión y de vaina de estos frutos 1, 2, 3 y 5 días después. Como referencia, se usaron muestras de frutos de la misma edad que se desarrollaron en condiciones normales. En ambos casos, las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Para el análisis del efecto de la sequía en los frutos, se eliminó el riego de las plantas del lote experimental partir del día en que la mayor parte de los frutos tenía 20 días de edad (DDF), mientras que las plantas del lote control continuaron siendo regadas. En ambos lotes, se tomaron muestras de embrión y de vaina desde los 20 hasta los 35 DDF. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

5.2. Registro del peso seco de frutos

Se registró el peso seco de los frutos que se desarrollaron en condiciones normales y de los frutos que se removieron de la planta o que se desarrollaron bajo sequía a partir de los 20 DDF. Los frutos utilizados para estas mediciones se obtuvieron en muestreos iguales a los descritos previamente y se secaron incubándolos a 45°C por una semana.

5.3. Preparación de extractos de proteína para análisis enzimáticos

Las muestras de tejido tanto de vaina como de embrión (~0.5 g peso fresco) se maceraron a 4°C usando 2 mL de una solución amortiguadora basada en el protocolo de Weiner et al. (1992) y con las siguientes concentraciones: HEPES 50 mM, pH 7.4, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM, Tritón X-100 al 0.1% y glicerol al 10%. Se agregó polivinilpirrolidona (PVP) (2 g/L) al amortiguador al momento de usarse. El macerado se vertió en un microtubo de 1.5 mL y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min. Se tomó 1 mL del sobrenadante y se desaló usando columnas Sephadex G-

10 equilibradas previamente con el mismo amortiguador sin PVP. El extracto desalado se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C hasta su uso.

5.4. Ensayos de actividad enzimática

Para la determinación de la actividad de la invertasa neutra presente en los extractos de proteína se usó el ensayo A, que contenía $30\ \mu\text{L}$ de extracto desalado y $70\ \mu\text{L}$ de mezcla de reacción [MOPS-KOH 50 mM, pH 7.5, MgCl_2 10 mM, KCl 15 mM, NAD^+ 2 mM, ATP 2 mM, sacarosa 10 mM, $2\ \text{U mL}^{-1}$ de hexocinasa (*Saccharomyces cerevisiae*), $2\ \text{U mL}^{-1}$ de fosfoglucosa isomerasa (*S. cerevisiae*) y $2\ \text{U mL}^{-1}$ de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*Leuconostoc mesenteroides*)].

Se midió en espectrofotómetro a 340 nm la producción de NADH por las enzimas acoplantes en el medio de reacción (Figura 5.2) y a partir de la glucosa y la fructosa producidas por la actividad de la invertasa neutra. El valor de la $\Delta A_{340}\ \text{min}^{-1}$ obtenido en ensayos de cinco minutos de duración se convirtió a μmol de sacarosa degradada por minuto ($\mu\text{mol Suc min}^{-1}$) usando la ecuación de una curva patrón obtenida al procesar $30\ \mu\text{L}$ de una disolución de concentraciones conocidas de fructosa y $70\ \mu\text{L}$ de la mezcla de reacción usada en el ensayo A.

La actividad de la sacarosa sintasa se determinó usando el ensayo B, que contenía $30\ \mu\text{L}$ de extracto desalado y $70\ \mu\text{L}$ de la mezcla de reacción usada en el ensayo A que incluía además UDP 10 mM, para permitir la degradación de sacarosa por parte de la sacarosa sintasa. Debido a que el valor de la $\Delta A_{340}\ \text{min}^{-1}$ del ensayo B incluye las actividades de la sacarosa sintasa y de la invertasa neutra en el extracto, se le restó el valor la $\Delta A_{340}\ \text{min}^{-1}$ del ensayo A. El residuo correspondió a la actividad de la sacrosa sintasa y se convirtió también a $\mu\text{mol Suc min}^{-1}$. Finalmente, el valor de $\mu\text{mol Suc min}^{-1}$ obtenido para la invertasa neutra

se dividió entre dos, ya que cada mol de NAD^+ reducido equivale a 2 mol de sacarosa degradada en el ensayo A.

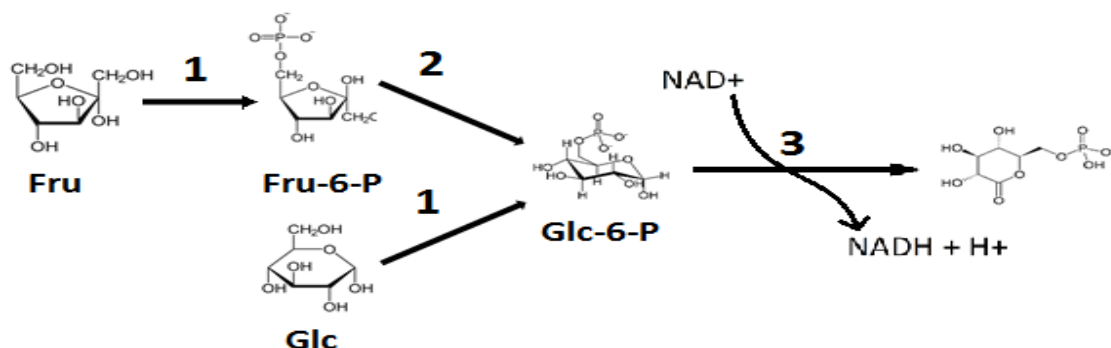


Figura 5.2. Ensayo usado para la determinación de la actividad enzimática. La fosforilación de la fructosa (**Fru**) y la glucosa (**Glc**) por la hexocinasa (**1**) genera fructosa-6-fosfato (**Fru-6-P**) y glucosa-6-fosfato (**Glc-6-P**), respectivamente. Posteriormente, la isomerización de la **Fru-6-P** por la fosfoglucosa isomerasa (**2**), genera **Glc-6-P**. Finalmente, la **Glc-6-P** es oxidada por la Glc-6-P deshidrogenasa (**3**), generando cantidades de $\text{NADH} + \text{H}^+$ proporcionales a la cantidad de glucosa y fructosa producidas por la sacarosa sintasa y la invertasa neutra.

5.5. Cuantificación de proteína

La proteína presente en las muestras se cuantificó por el método de Bradford (1976). Se usaron 5 μL de extracto de embrión o 10 μL de extracto de vaina, agua desionizada hasta completar 50 μL , y 200 μL de reactivo de Bradford. La A_{595} obtenida se convirtió a μg de proteína a partir de la ecuación de una curva patrón elaborada con albúmina bovina (BSA). Finalmente, se calculó la actividad específica de cada una de las dos enzimas, sacarosa sintasa e invertasa neutra, la cual se expresó como μmol de sacarosa degradada por minuto y por miligramo de proteína ($\mu\text{mol Suc min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$).

5.6. Análisis estadístico

Los valores de actividad enzimática específica presentados son el promedio \pm la desviación estándar ($\bar{x} \pm \text{D.E.}$) del análisis de tres o, excepcionalmente, dos muestras de tejido tanto de embrión como de vaina. Se usó la prueba t-Student en el programa R (versión 3.3.1) para establecer la significancia de la diferencia entre los valores de los tratamientos.

6. Resultados

6.1. Degradación enzimática de sacarosa en frutos removidos de la planta

La actividad específica de la sacarosa sintasa embrionaria fue baja tanto en condiciones normales como cuando los frutos fueron removidos de la planta, y solamente se pudo medir confiablemente en los frutos unidos a la planta de 23 a 25 DDF, presentando una ligera tendencia a incrementar (Figura 6.1A). En los embriones de frutos que se desarrollaron en condiciones normales, la actividad específica de invertasa neutra fue mayor que la de sacarosa sintasa (Figura 6.1), por lo que se sugiere que es la responsable de la mayor parte de la degradación de sacarosa que se observa. La actividad de la invertasa neutra se mantuvo constante entre los 20 y 22 DDF e incrementó aproximadamente un 50% hacia el día 25, por lo que fue significativamente mayor que en los embriones de frutos removidos de la planta ($P=0.0214$), en los que la actividad de invertasa neutra se mantuvo prácticamente constante durante el período de observación (Figura 6.1B).

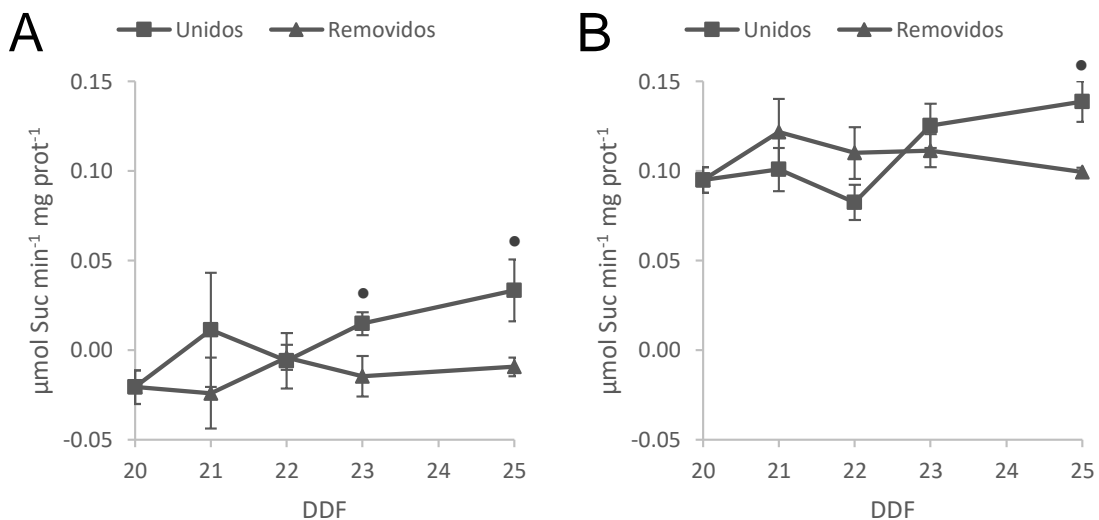


Figura 6.1 Actividad específica de la sacarosa sintasa (A) y de la invertasa neutra (B) embrionaria de frutos que permanecieron unidos a la planta o que fueron removidos a los 20 DDF. El nivel de significancia de la diferencia entre los tratamientos es representado por: • ($P \leq 0.05$).

La actividad de sacarosa sintasa detectada en vainas fue mucho mayor que la que se observó en los embriones. En las vainas de los frutos que se desarrollaron en condiciones normales, tuvo un aumento transitorio y alcanzó $1.42 \mu\text{mol Suc min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ a los 22 DDF (Figura 6.2A). De manera similar, cuando las vainas se removieron de la planta a los 20 DDF, se presentó un incremento parecido en magnitud, pero que ocurrió un día después de que fueron cortados de la planta (Figura 6.2A). La actividad de la invertasa neutra en vainas también fue mayor a la observada en embriones. En vainas de frutos unidos a la planta, permaneció constante entre los 20 y 25 DDF, solamente tuvo un incremento no significativo ($p=0.2542$) a los 22 DDF (Figura 6.2B). La tendencia fue estadísticamente similar en las vainas de los frutos removidos de la planta. En estos, el incremento de actividad observado del día 22 fue aparentemente mayor, sin embargo, no fue significativamente diferente ($p=0.1696$) del que se observó en las vainas unidas a la planta (Figura 6.2B).

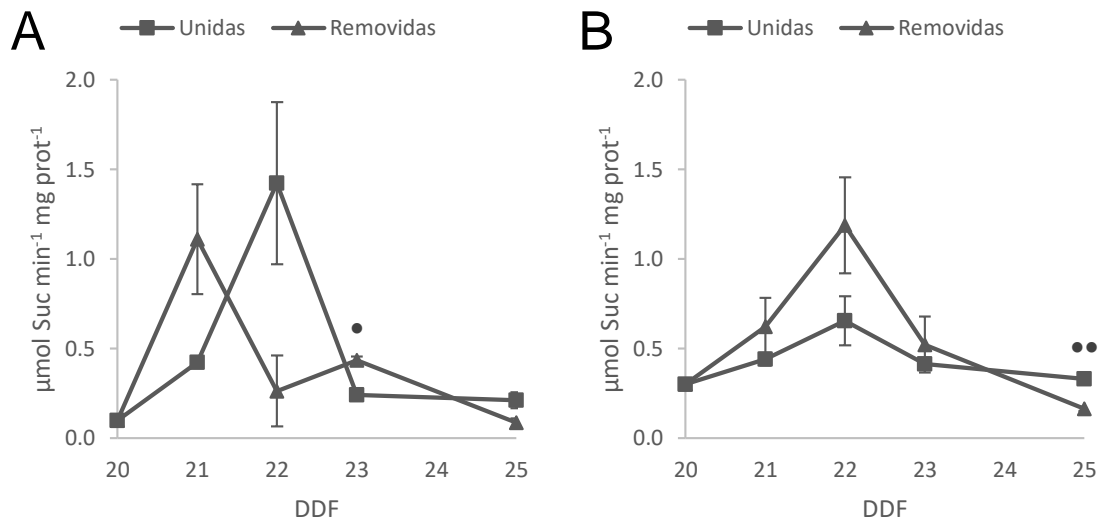


Figura 6.2. Actividad específica de la sacarosa sintasa (A) y de la invertasa neutra (B) en las vainas de los frutos que permanecieron unidos a la planta o que fueron removidos a los 20 DDF. El nivel de significancia de la diferencia entre los tratamientos es representado por: • ($P \leq 0.05$), •• ($P \leq 0.01$).

6.2. Degradación enzimática de sacarosa en frutos de plantas sometidas a sequía

En un ciclo de cultivo diferente, se analizaron nuevamente los embriones de frutos que se desarrollaron en condiciones normales. En esta ocasión se observó que la actividad de la sacarosa sintasa se mantuvo alrededor de $0.12 \mu\text{mol Suc min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ entre los 20 y 28 DDF y que posteriormente disminuyó hasta cerca de cero a los 32 DDF (Figura 6.3A).

La máxima actividad de sacarosa sintasa embrionaria en plantas sometidas a sequía se tuvo a los 22 DDF, tras un aumento que la hizo significativamente mayor ($p=0.0097$) que la actividad de embriones de la misma edad que se desarrollaron en condiciones normales. Sin embargo, a partir del día 22 disminuyó sostenida y más rápidamente que el control, hasta ser cercana a cero a los 28 DDF (Figura 6.3A). En las mediciones se observó que la actividad de la invertasa neutra disminuyó entre los 24 y 28 DDF y que la sequía no produjo cambios perceptibles en esa tendencia (Figura 6.3B).

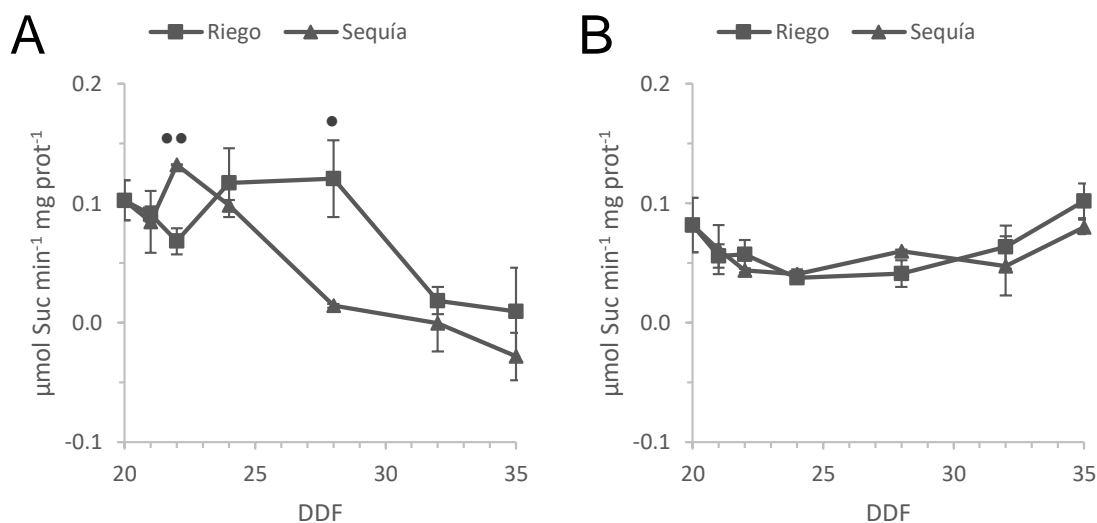


Figura 6.3. Actividad específica de la sacarosa sintasa (A) y de la invertasa neutra (B) embrionaria de plantas que se desarrollaron en condiciones normales o que dejaron de ser regadas a partir de los 20 DDF. El nivel de significancia de la diferencia entre los tratamientos es representado por: • ($P \leq 0.05$), •• ($P \leq 0.01$).

En las vainas de las plantas cultivadas bajo riego, las actividades específicas de la sacarosa sintasa y de la invertasa neutra aumentaron transitoriamente entre los 20 y 24 DDF (Figura 6.4). A partir del día 28, la actividad de invertasa neutra se mantuvo constante alrededor de $0.2 \mu\text{mol Suc min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ (Figura 6.4B), mientras que la sacarosa sintasa incrementó y se volvió la enzima principal en la degradación de sacarosa (Figura 6.4A).

En las vainas de plantas sometidas a sequía, la actividad de la sacarosa sintasa aumentó entre los 20 y 24 DDF y alcanzó un máximo de $0.26 \mu\text{mol Suc min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$, un valor significativamente mayor ($p=0.0263$) que las vainas de la misma edad que se desarrollaron en condiciones normales. Esta actividad se mantuvo hasta los 28 DDF y, a partir de este día, se redujo a la mitad (Figura 6.4A). La actividad de la invertasa neutra en estas vainas aumentó entre los 20 y 24 DDF, hasta una actividad máxima de $0.57 \mu\text{mol Suc min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$. Posteriormente, disminuyó gradualmente hasta ser casi cero el día 35 (Figura 6.4B).

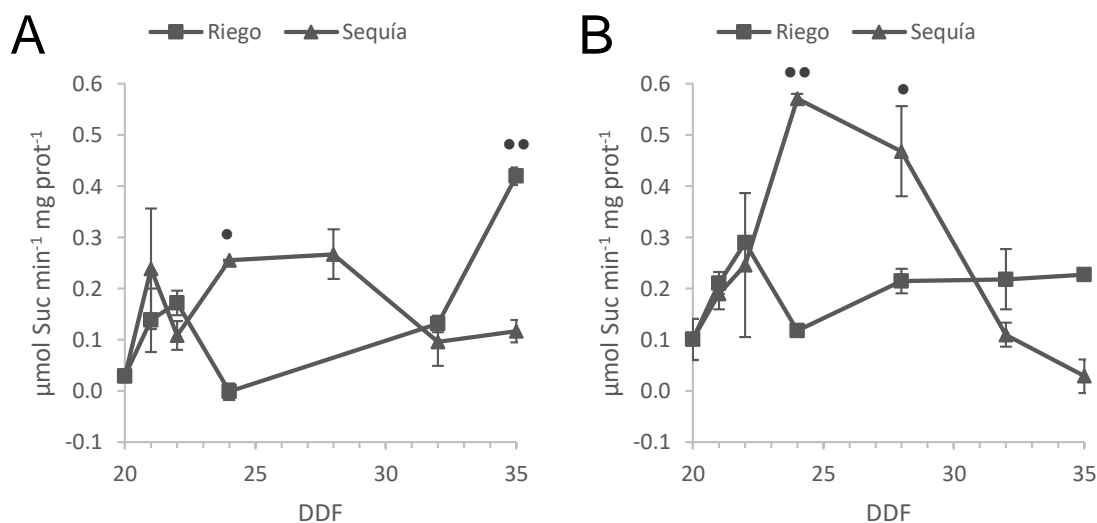


Figura 6.4. Actividad específica de la sacarosa sintasa (A) y de la invertasa neutra (B) en las vainas de plantas que se desarrollaron en condiciones normales o que dejaron de ser regadas a partir de los 20 DDF. El nivel de significancia de la diferencia entre los tratamientos es representado por: • ($P \leq 0.05$), •• ($P \leq 0.01$)

6.3. La fuerza de demanda en relación a las condiciones ambientales

La fuerza de demanda de los embriones y de las vainas se estimó en función de las actividades de la sacarosa sintasa y de la invertasa neutra, y se calculó sumando las actividades específicas de ambas enzimas. La fuerza de demanda resultó similar en embriones unidos y removidos de la planta entre los 20 y 22 DDF, pero comenzó a diferenciarse a partir del día 23, cuando incrementó significativamente ($p=0.0113$) en los embriones de frutos unidos a la planta, mientras que en los embriones de frutos removidos permaneció constante (Figura 6.5A).

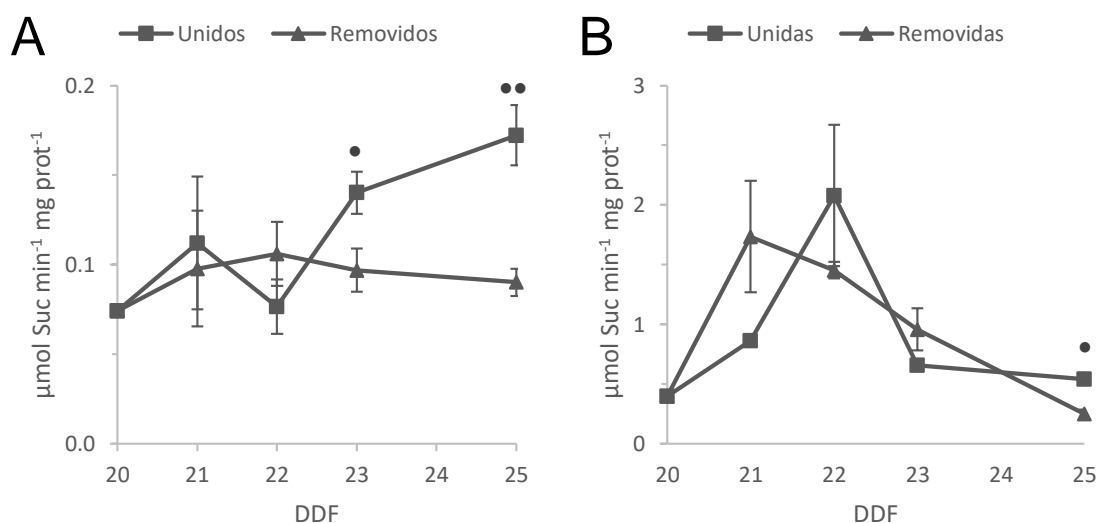


Figura 6.5. Fuerza de demanda de embriones (A) y de vainas (B) en frutos que se desarrollaron unidos a la planta o que fueron removidos a los 20 DDF. El nivel de significancia de la diferencia entre los tratamientos es representado por: • ($P \leq 0.05$), •• ($P \leq 0.01$).

En vainas de frutos unidos a la planta, la fuerza de demanda fue considerablemente mayor a la de los embriones y tuvo un aumento transitorio el día 22 DDF (Figura 6.5). En las vainas removidas también se tuvo un aumento transitorio, pero en esta ocasión se adelantó un día y se presentó al día siguiente de que los frutos fueron removidos (Figura 6.5B). Sin

embargo, no hubo diferencia una significativa ($P \leq 0.05$) entre la fuerza de demanda de las vainas en condiciones normales y las que se removieron de la planta (Figura 6.5).

También se evaluó el efecto de la sequía sobre la fuerza de demanda de los frutos. En el caso de los embriones en riego y de los embriones sometidos a sequía, la fuerza de demanda fue similar entre los 20 y 24 DDF. Posteriormente, se redujo en los embriones en sequía mientras que en los embriones en condiciones normales dicha fuerza permaneció elevada por más tiempo (Figura 6.6A). La fuerza de demanda fue similar en vainas desarrolladas en ambas condiciones, entre los 20 y 22 DDF (Figura 6.6B). Sin embargo, a partir del día 24, se observó un aumento significativo ($p=0.0009$) en las vainas sometidas a sequía mientras que en las vainas de plantas regadas hubo una disminución importante. Finalmente, esto se invirtió y, a los 35 DDF, la fuerza de demanda fue mayor en las vainas en condiciones normales (Figura 6.6B).

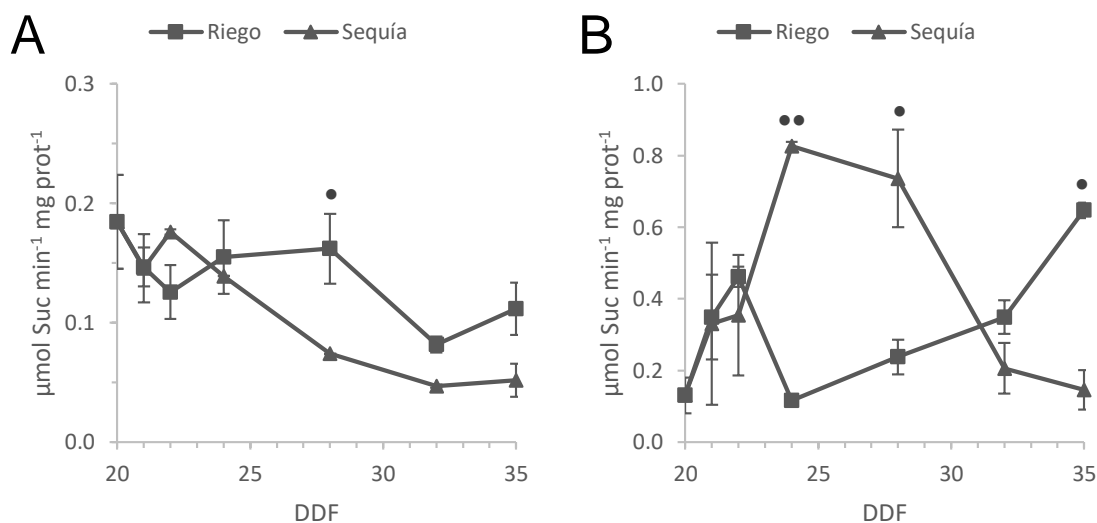


Figura 6.6. Fuerza de demanda de embriones (A) y de vainas (B) de plantas que se desarrollaron en condiciones normales o que dejaron de ser regadas a partir de los 20 DDF. El nivel de significancia de la diferencia entre los tratamientos es representado por: • ($P \leq 0.05$), •• ($P \leq 0.01$).

6.4. Efecto de las condiciones ambientales adversas sobre el peso seco de las semillas

No se encontró un cambio significativo ($P \leq 0.05$) en el peso seco de las semillas (Figura 6.7A) ni de las vainas (Figura 6.7B) durante los cinco días posteriores a la remoción de los frutos. De igual manera, la relación entre el peso seco de semillas y vainas, que es un indicador de la transferencia de biomasa entre estos órganos, no se alteró significativamente en los frutos removidos, respecto al valor observado en el día 20 (Figura 6.7C). Sin embargo, las semillas de los frutos que se desarrollaron en condiciones normales sí aumentaron su peso seco al día 25 (Figura 6.7A) y, debido a que la vaina de estos frutos no acumuló biomasa entre los 20 y 25 DDF (Figura 6.7B), también se observó un incremento notable en la relación entre el peso seco de semillas y vainas (Figura 6.7C).

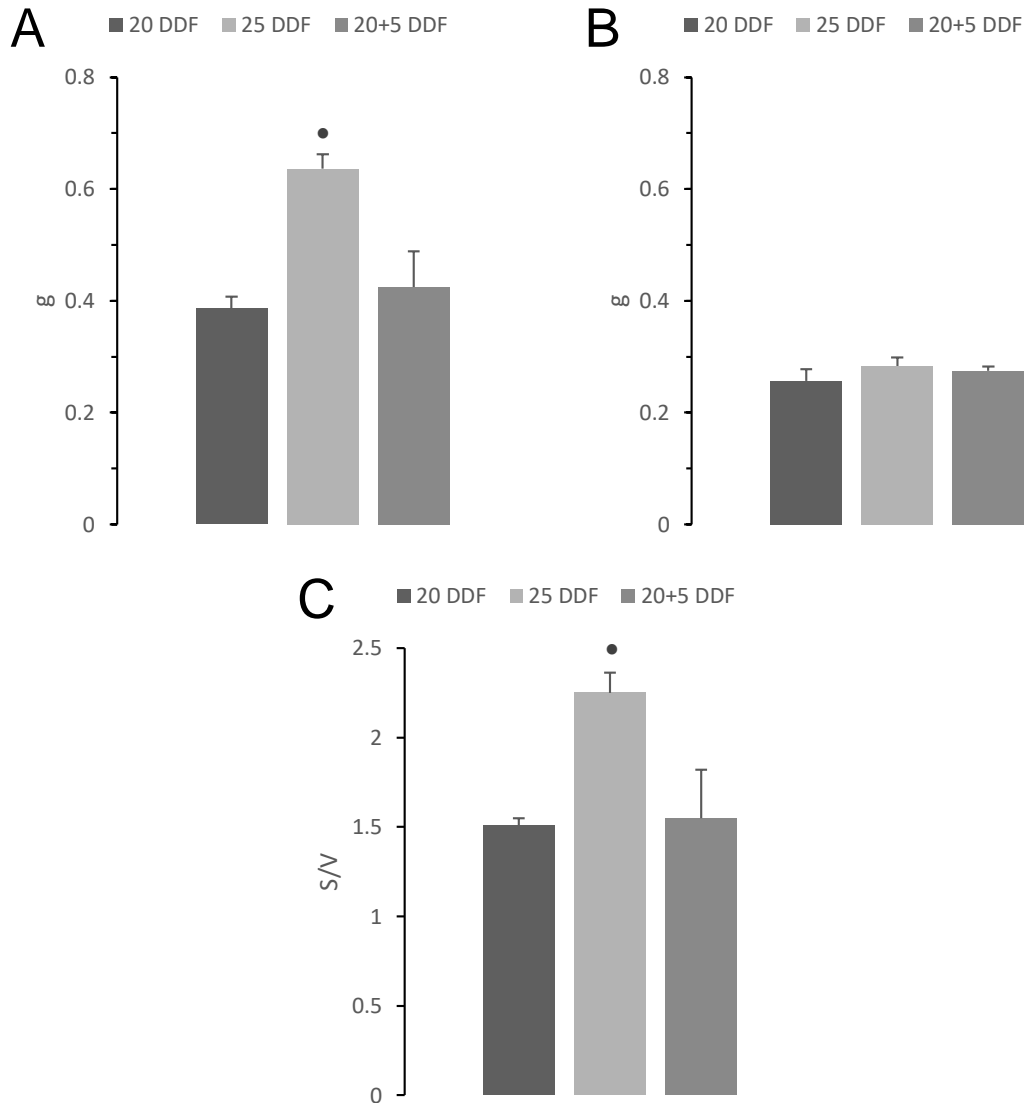


Figura 6.7. Aumento de peso seco en las semillas (A) y en las vainas (B), y la relación del peso seco semillas/vaina (C), en frutos que se desarrollaron unidos a la planta o que fueron removidos a partir de los 20 DDF. El nivel de significancia de la diferencia al final de los tratamientos es representado por: • ($P \leq 0.05$), •• ($P \leq 0.01$).

En la evaluación del impacto de la sequía sobre la acumulación de biomasa en frutos de frijol, se encontró que el peso seco de las semillas incrementó tanto en condiciones normales como en sequía. Sin embargo, el aumento visto fue significativamente mayor ($P \leq 0.01$) en los frutos que se desarrollaron en condiciones normales (Figura 6.8A). A diferencia de las semillas, las vainas no acumularon biomasa bajo sequía, aunque su peso seco

incrementó en condiciones normales (Figura 6.8B). El aumento de peso seco tanto en semillas como en vainas desarrolladas en condiciones normales, y el poco crecimiento que éstas tuvieron bajo sequía, contribuyeron a que la relación entre el peso seco de semillas y vainas no fuera diferente entre ambos tratamientos (Figura 6.8C).

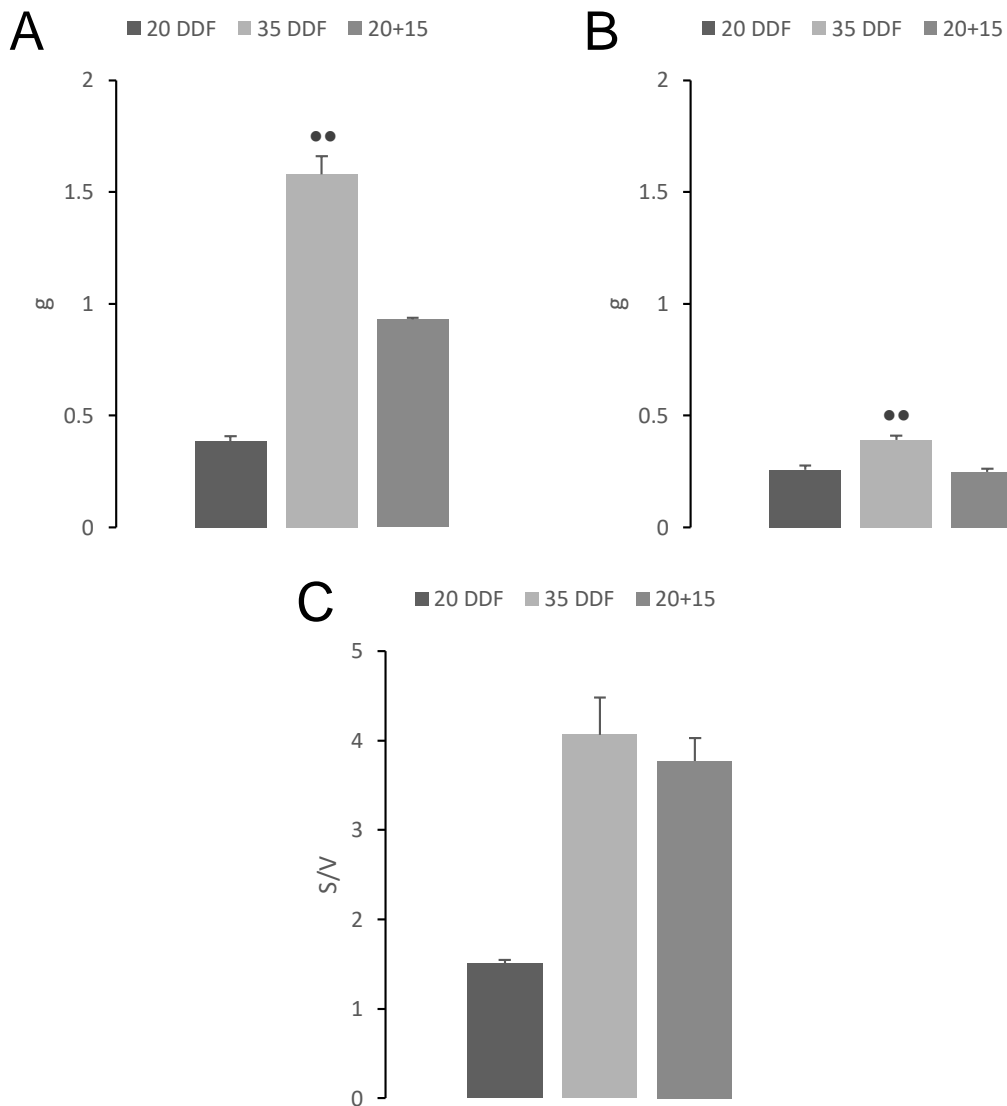


Figura 6.8. Aumento de peso seco en las semillas (A) y en las vainas (B), así como la relación del peso seco semillas/vaina (C), en plantas que se cultivaron en condiciones normales o que dejaron de ser regadas a partir de los 20 DDF. El nivel de significancia de la diferencia al final de tratamientos es representado por: • ($P \leq 0.05$), •• ($P \leq 0.01$).

La eliminación del riego ocasionó la marchitez prematura de las plantas, sin embargo, en la etapa final del experimento, muchas hojas de las plantas cultivadas con riego también mostraron síntomas de senescencia (Figura 6.9).



Figura 6.9. Efecto de la sequía aplicada a partir de los 20 DDF (planta de la derecha).

7. Discusión

La maduración de las semillas es un proceso complejo que depende de los niveles de carbohidratos, de fitohormonas, de las actividades de diversas enzimas y de muchos otros factores, así como del efecto que el ambiente puede tener sobre estas variables (Weber et al. 2005). En este estudio se observó que la degradación enzimática de sacarosa durante la fase de maduración de semillas en frutos del frijol Canario 60 se altera bajo condiciones ambientales adversas. Se sugiere que las modificaciones observadas fueron importantes para favorecer el desarrollo exitoso de las semillas bajo la limitación nutricional generada por la remoción de los frutos o por el déficit hídrico durante la maduración de las semillas.

7.1. La degradación enzimática de sacarosa aumenta durante la maduración de las semillas de frijol

La actividad enzimática de sacarosa sintasa fue escasa en embriones antes de los 23 DDF, pero tendió a incrementar a partir de ese día (Figura 6.1A). Este cambio puede marcar el inicio de la fase de maduración, pues nuestros resultados concuerdan con otros ya reportados, en los que se indica que la actividad de la sacarosa sintasa en embriones es baja durante la fase de división celular e incrementa para sostener la elevada demanda metabólica en la fase de maduración (Weber et al. 2005).

La actividad de la invertasa neutra embrionaria fue mayor a la de la sacarosa sintasa, sin embargo, siguió un parón similar al de sacarosa sintasa (Figura 6.1B), sugiriendo que las actividades de ambas enzimas están sujetas a controles similares cuando los frutos se encuentran en condiciones normales. Estos aumentos de actividad enzimática incrementan la cantidad de hexosas que ingresan al metabolismo y satisfacen la elevada demanda nutricional y energética que plantea la biosíntesis masiva de sustancias de reserva (Ross et al. 1996;

Vargas et al. 2008; Rolletschek et al. 2003; Weber et al. 2005; Asano et al. 2002; Baroja-Fernández et al. 2003; Déjardin et al. 1997).

La fuerza de demanda de los embriones tuvo un aumento importante en esta fase debido al aumento en la actividad de la invertasa neutra (Figura 6.5A). Resultados similares se han reportado durante la maduración de semillas de haba, en cuyo caso, el aumento en la actividad de invertasa neutra es producto del incremento en la cantidad de enzima (den Ende & Van Laere 1993; Ross et al. 1996).

7.2. La movilización de reservas en la vaina es deficiente en la variedad Canario 60

Durante los cinco días posteriores a la remoción de los frutos, la actividad de la sacarosa sintasa de embriones permaneció por debajo del nivel de detección y, la actividad de la invertasa neutra, sin cambios (Figura 6.1). Si realmente los incrementos en las actividades de ambas enzimas en embriones a partir de los 23 DDF fueron un indicador del inicio de la maduración de las semillas, la remoción de los frutos retrasó el inicio de la maduración, tal vez, y como se discute a continuación, debido a una disminución en el suministro de nutrientes hacia las semillas.

En los frutos de frijol, el desarrollo de la vaina y de los embriones es asincrónico, ocurre primero en la vaina y después de que ésta ha alcanzado su tamaño máximo, se observa un crecimiento acelerado de los embriones, el cual está directamente relacionado con la acumulación de grandes cantidades de almidón y de proteínas. En el genotipo de frijol V8025 se observa que, cuando los frutos son removidos de la planta 20 DDF, la movilización de las reservas nutricionales presentes en la vaina madura permite que el desarrollo de algunas semillas continúe durante los 5 días posteriores al corte (Coello & Martínez-Barajas 2016).

Es posible que este mecanismo sea más lento o ineficiente en la variedad Canario 60, pues la biomasa de la vaina no disminuyó 5 días después de la remoción de los frutos (Figura

6.7B), indicando que las reservas no se degradaron o que los productos de su degradación no se transportaron. Esto pudo generar un déficit nutricional que limitó el crecimiento de las semillas de frijol (Figura 6.7A), al igual que la reducción en el suministro de sacarosa, principal molécula nutritiva para los embriones, impide la continuación del desarrollo de las semillas de otras leguminosas (Westgate et al. 1989).

Una elevada fuerza de demanda en embriones permitiría que las pocas reservas disponibles pudieran transportarse desde la vaina hacia las semillas. Sin embargo, aun en condiciones normales, la fuerza de demanda correspondiente a las actividades de sacarosa sintasa e invertasa neutra de vainas es mayor que la de embriones (Figura 6.5). Es posible que la actividad de estas dos enzimas no sea suficiente para explicar la distribución de los nutrientes hacia las semillas. El otro componente de la fuerza de demanda de embriones en fase de maduración es la actividad de los transportadores de sacarosa (Minchin & Lacointe 2005; Weber et al. 2005), y podría ser el principal efector del transporte de sacarosa hacia las semillas, cuya contribución podría evaluarse en un trabajo posterior.

Otra posibilidad, sugerida por la elevada hidrólisis de sacarosa (Figura 6.5B) y el inesperado crecimiento en las vainas después de los 20 DDF (Figura 6.8B), es que en esa etapa, las vainas del genotipo Canario 60 funcionen como sumideros temporales de sacarosa y que los productos de su degradación podrían transportarse después a las semillas. Sin embargo, la remoción de los frutos no tiene ningún efecto perceptible en sus actividades de sacarosa sintasa e invertasa neutra (Figura 6.2B), de modo que los incrementos transitorios que vemos tanto en condiciones normales como estresantes podrían estar relacionados con el desarrollo de la vaina en vez de formar parte de una respuesta a la remoción de los frutos que permita el posterior desarrollo de las semillas, pues estos frutos presentan una condición

fisiológica que, aunque no es realista, puede ayudarnos a comprender la movilización de reservas en tejidos vegetativos usando un sistema simple.

7.3. Las semillas tienen un crecimiento menor bajo sequía

El déficit hídrico aplicado a partir de los 20 DFF pudo ser una causa de la reducción prematura observada de la actividad de la sacarosa sintasa embrionaria (Figura 6.3A). Tal vez esto explica por qué el crecimiento de las semillas durante la fase de maduración tuvo una importante reducción bajo sequía (Figura 6.8A). Sin embargo, la actividad de invertasa neutra embrionaria no fue alterada por la sequía (Figura 6.3B), sugiriendo que, a diferencia de las condiciones normales, la sequía podría ocasionar que la regulación de la actividad enzimática de estas dos proteínas sea diferente. Sin embargo, esta hipótesis solamente podría evaluarse en un trabajo posterior.

En condiciones adversas, la movilización de los materiales acumulados en las hojas también puede contribuir al desarrollo de las semillas (Schiltz et al. 2004; Lee et al. 2004; Yang et al. 2004). La inducción de la senescencia foliar por sequía observada (Figura 6.9) puede contribuir a incrementar la importancia de los materiales que las hojas son capaces de movilizar y es posible que, en el genotipo Canario 60, la movilización efectiva de materiales acumulados en las hojas sea la principal fuente de nutrientes para las semillas, compensando el escaso reciclaje de reservas de la vaina (Figura 6.8B).

7.4. Posibles blancos para aumentar el rendimiento de los cultivos de frijol Canario 60

El frijol Canario 60 es una de las variedades de mayor demanda en el mercado mexicano. Sin embargo, la sequía ocasiona elevadas pérdidas en su productividad (Sangerman-Jarquín et al. 2010; Cuellar-Ortiz et al. 2008). En este estudio se identificó que las actividades de la sacarosa sintasa y de la invertasa de los embriones podrían estar relacionadas directamente con la maduración de las semillas en condiciones normales y bajo

estrés ambiental. Debido al incremento notable de las actividades enzimáticas en la vaina y la importancia de este órgano en la movilización de materiales acumulados bajo condiciones adversas en otros genotipos de frijol (Cuellar-Ortiz et al. 2008; Rosales et al. 2012; Coello & Martínez-Barajas 2016), se sugiere que en este caso estas dos variables están ligadas, contribuyendo a establecer antecedentes respecto al metabolismo de la sacarosa durante el reciclaje de materiales acumulados en los tejidos vegetativos.

Sin embargo, la deficiente movilización de reservas desde la vaina hacia las semillas de la variedad Canario 60, caracterizada por Cuellar-Ortiz et al. (2008) y que también se identificó en este estudio, es una gran limitante de su productividad bajo condiciones adversas y una determinante de su elevada sensibilidad a la sequía. La caracterización de los mecanismos que dirigen la degradación de las sustancias de reserva en todos los tejidos vegetativos y su movilización hacia las semillas en desarrollo, durante el déficit nutricional generado por la sequía, podrían contribuir a mejorar el rendimiento de esta variedad. También es posible que, aplicando análisis similares a éste en un número mayor de genotipos, se pueda identificar alguno que, mediante cruzamientos, complemente la deficiente movilización y elevada sensibilidad a la sequía del genotipo Canario 60.

8. Conclusiones

1. Las actividades de sacarosa sintasa e invertasa neutra se incrementan en los embriones que se desarrollan en condiciones normales y se mantienen elevadas en un período que corresponde con la biosíntesis masiva de sustancias de reserva.
2. La restricción nutricional resultante al cortar los frutos o someter las plantas a sequía induce cambios en las actividades enzimáticas relacionados con un menor crecimiento de las semillas.
3. La sequía ocasiona una disminución de la actividad de sacarosa sintasa embrionaria que está relacionada con el menor crecimiento de las semillas.
4. Bajo el déficit hídrico impuesto, las actividades de la sacarosa sintasa y de la invertasa neutra tienen un aumento muy importante en las vainas, lo que podría contribuir a que este órgano funcione como un sumidero temporal de los nutrientes generados en el resto de la planta y destinados a ser transferidos hacia las semillas.
5. La biomasa acumulada en las vainas no se moviliza eficientemente. El reciclaje de los materiales acumulados en las hojas compensa la escasa participación de las vainas en la nutrición de las semillas bajo sequía.
6. La remoción de los frutos es una condición más severa que la sequía para la maduración de las semillas de la variedad Canario 60 porque implica una reducción total del suministro de nutrientes hacia los embriones.

9. Literatura citada

- Abid, G. et al., 2009. A spatiotemporal analysis of sucrose synthase during seed development in wild-type and EMS mutant embryos of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using in situ hybridization. *New Biotechnology*, 25, pp.S361--S362.
- Acosta-Díaz, E. et al., 2009. Adaptation traits in dry bean cultivars grown under drought stress. *Agricultura Técnica en México*, 35(4), pp.416–425.
- Asano, T. et al., 2002. Rice SPK, a calmodulin-like domain protein kinase, is required for storage product accumulation during seed development: phosphorylation of sucrose synthase is a possible factor. *The Plant Cell*, 14(3), pp.619–28.
- Baroja-Fernández, E. et al., 2003. Sucrose synthase catalyzes the de novo production of ADPglucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants. *Plant & Cell Physiology*, 44(5), pp.500–509.
- Barrios Gómez, E.J. et al., 2011. Avances en el mejoramiento genético del frijol en México por tolerancia a temperatura alta y a sequía. *Revista fitotecnia mexicana*, 34, pp.247–255.
- Bellon, R.M. et al., 2009. Diversidad y conservación de recursos genéticos en plantas cultivadas. In *Capital natural de México, Estado de conservación y tendencias de cambio*. pp. 355–382. Available at: <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.5040.5922>.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), pp.248–254. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Ciereszko, I. & Kleczkowski, L.A., 2002. Glucose and mannose regulate the expression of a major sucrose synthase gene in Arabidopsis via hexokinase-dependent mechanisms.

Plant Physiology and Biochemistry, 40(11), pp.907–911.

Coello, P. & Martínez-Barajas, E., 2016. Changes in nutrient distribution are part of the mechanism that promotes seed development under severe nutrient restriction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 99, pp.21–26.

Cuellar-Ortiz, S.M. et al., 2008. Relationship between carbohydrate partitioning and drought resistance in common bean. *Plant, Cell & Environment*, 31(10), pp.1399–1409.

Déjardin, A. et al., 1997. Contribution of sucrose synthase, ADP-glucose pyrophosphorylase and starch synthase to starch synthesis in developing pea seeds. *Plant, Cell & Environment*, 20(11), pp.1421–1430. Available at: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3040.1997.d01-32.x>.

Delgado-Salinas, A., Bibler, R. & Lavin, M., 2006. Phylogeny of the Genus *Phaseolus* (Leguminosae): A Recent Diversification in an Ancient Landscape. *Systematic Botany*, 31(4), pp.779–791. Available at: <http://dx.doi.org/10.1600/036364406779695960>.

den Ende, W. & Van Laere, A., 1993. Purification and properties of an invertase with sucrose: sucrose fructosyltransferase (SST) activity from the roots of *Cichorium intybus* L. *New Phytologist*, 123(1), pp.31–37. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb04528.x>.

Food and Agriculture Organization, 2016. FAOSTAT. Available at: <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/e>.

Gao, J. et al., 2014. Light modulated activity of root alkaline/neutral invertase involves the interaction with 14-3-3 proteins. *Plant Journal*, 80(5), pp.785–796. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.12677>.

- Graham, P.H. & Ranalli, P., 1997. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research*, 53(1–3), pp.131–146. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4290\(97\)00112-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4290(97)00112-3).
- Hardin, S.C. et al., 2003. Phosphorylation of sucrose synthase at serine 170: occurrence and possible role as a signal for proteolysis. *The Plant Journal*, 35(5), pp.588–603. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-313X.2003.01831.x> [Accessed October 7, 2016].
- Hennen-Bierwagen, T.A. et al., 2009. Proteins from Multiple Metabolic Pathways Associate with Starch Biosynthetic Enzymes in High Molecular Weight Complexes: A Model for Regulation of Carbon Allocation in Maize Amyloplasts. *Plant Physiology*, 149(3), pp.1541–1559. Available at: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.135293>.
- Huber, S.C. et al., 1996. Phosphorylation of serine-15 of maize leaf sucrose synthase. Occurrence in vivo and possible regulatory significance. *Plant Physiology*, 112(2), pp.793–802.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2015. Estadísticas por tema. Available at: <http://www.inegi.org.mx/>.
- Jiang, Q. et al., 2011. The wheat (*T. aestivum*) sucrose synthase 2 gene (*TaSus2*) active in endosperm development is associated with yield traits. *Functional & Integrative Genomics*, 11(1), pp.49–61. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10142-010-0188-x>.
- Lee, Koizumi, N. & Sano, H., 2004. Identification of genes that are up-regulated in concert during sugar depletion in Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment*, 27(3), pp.337–345. Available at: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3040.2004.01146.x>.
- Lemoine, R. et al., 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental

- factors. *Frontiers in Plant Science*, 4. Available at:
<http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2013.00272>.
- Lou, Y., Gou, J.-Y. & Xue, H.-W., 2007. PIP5K9, an Arabidopsis Phosphatidylinositol Monophosphate Kinase, Interacts with a Cytosolic Invertase to Negatively Regulate Sugar-Mediated Root Growth. *The Plant Cell*, 19(1), pp.163–181. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1105/tpc.106.045658>.
- Minchin, P.E.H. & Lacoite, A., 2005. New understanding on phloem physiology and possible consequences for modelling long-distance carbon transport. *New Phytologist*, 166(3), pp.771–779. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01323.x>.
- Murayama, S. & Handa, H., 2007. Genes for alkaline/neutral invertase in rice: alkaline/neutral invertases are located in plant mitochondria and also in plastids. *Planta*, 225(5), pp.1193–1203. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-006-0430-x>.
- Nassar, R.M.A., Ahmed, Y.M. & Boghdady, M.S., 2010. Botanical studies on Phaseolus vulgaris L. I-Morphology of Vegetative and Reproductive Growth. *International Journal of Botany*, 6(3), pp.323–333. Available at:
<http://dx.doi.org/10.3923/ijb.2010.323.333>.
- Núñez, J.G.A. et al., 2008. Study of AtSUS2 Localization in Seeds Reveals a Strong Association with Plastids. *Plant and Cell Physiology*, 49(10), pp.1621–1626. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcn117>.
- Padilla-Bernal, L.E. et al., 2012. Competitividad , eficiencia e impacto ambiental de la producción de frijol (Phaseolus vulgaris L .) en Zacatecas , México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(6), pp.1187–1201.

- Polit, J.T. & Ciereszko, I., 2012. Sucrose synthase activity and carbohydrates content in relation to phosphorylation status of *Vicia faba* root meristems during reactivation from sugar depletion. *Journal of Plant Physiology*, 169(16), pp.1597–1606. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2012.04.017>.
- Purcell, P.C., Smith, A.M. & Halford, N.G., 1998. Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *The Plant Journal*, 14(2), pp.195–202. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-313X.1998.00108.x> [Accessed April 29, 2016].
- Rolletschek, H., Weber, H. & Borisjuk, L., 2003. Energy Status and Its Control on Embryogenesis of Legumes. Embryo Photosynthesis Contributes to Oxygen Supply and Is Coupled to Biosynthetic Fluxes. *PLANT PHYSIOLOGY*, 132(3), pp.1196–1206. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.102.017376> [Accessed May 16, 2016].
- Rosales, M.A. et al., 2012. Physiological analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars uncovers characteristics related to terminal drought resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 56, pp.24–34. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.04.007>.
- Ross, H.A., McRae, D. & Davies, H. V, 1996. Sucrolytic Enzyme Activities in Cotyledons of the Faba Bean (Developmental Changes and Purification of Alkaline Invertase). *Plant Physiology*, 111(1), pp.329–338. Available at: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.111.1.329>.
- Sangerman-Jarquín, D.M. et al., 2010. Consideraciones e importancia social en torno al cultivo del frijol en el centro de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*,

1(3), pp.363–380.

Schiltz, S. et al., 2004. Proteome reference maps of vegetative tissues in pea. An investigation of nitrogen mobilization from leaves during seed filling. *Plant physiology*, 135(4), pp.2241–60. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15299134> [Accessed May 13, 2016].

Schmutz, J. et al., 2014. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics*, 46(7), pp.707–713. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1038/ng.3008>.

Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación, 2006.

Situación actual y perspectivas de frijol en México, Ciudad de México: Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación.

Silvente, S., Camas, A. & Lara, M., 2003. Heterogeneity of sucrose synthase genes in bean (*Phaseolus vulgaris* L.): evidence for a nodule enhanced sucrose synthase gene.

Journal of Experimental Botany, 54(383), pp.749–755. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erg086>.

Subbaiah, C.C. et al., 2006. Mitochondrial Localization and Putative Signaling Function of Sucrose Synthase in Maize. *Journal of Biological Chemistry*, 281(23), pp.15625–

15635. Available at: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m600355200>.

Vargas, W.A., Pontis, H.G. & Salerno, G.L., 2008. New insights on sucrose metabolism: evidence for an active A/N-Inv in chloroplasts uncovers a novel component of the

intracellular carbon trafficking. *Planta*, 227(4), pp.795–807. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1007/s00425-007-0657-1>.

Weber, H., Borisjuk, L. & Wobus, U., 2005. MOLECULAR PHYSIOLOGY OF

LEGUME SEED DEVELOPMENT. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), pp.253–

279. Available at: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144201>.

Weiner, H., McMichael, R.W. & Huber, S.C., 1992. Identification of factors regulating the phosphorylation status of sucrose-phosphate synthase in vivo. *Plant physiology*, 99(4), pp.1435–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16669055> [Accessed October 11, 2016].

Westgate, M.E. et al., 1989. Effect of Water Deficits on Seed Development in Soybean : II. Conservation of Seed Growth Rate. *Plant physiology*, 91(3), pp.980–5. Available at: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.91.3.980> [Accessed July 19, 2016].

Yang, J. et al., 2004. Activities of Key Enzymes in Sucrose-to-Starch Conversion in Wheat Grains Subjected to Water Deficit during Grain Filling. *PLANT PHYSIOLOGY*, 135(3), pp.1621–1629. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.104.041038> [Accessed May 1, 2016].

Yao, S.-G. et al., 2009. Analysis of the rice SHORT-ROOT5 gene revealed functional diversification of plant neutral/alkaline invertase family. *Plant Science*, 176(5), pp.627–634. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.02.002>.

Zheng, Y. et al., 2011. The Structure of Sucrose Synthase-1 from *Arabidopsis thaliana* and Its Functional Implications. *Journal of Biological Chemistry*, 286(41), pp.36108–36118. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M111.275974>.