



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE AMILASAS EN VAINAS DE
FRUTOS DE FRIJOL SOMETIDOS A ESTRÉS NUTRICIONAL**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

AXEL RADILLA OSORIO



CIUDAD DE MÉXICO

2018



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. J. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS
VOCAL: DRA. MIREYA RODRÍGUEZ PENAGOS
SECRETARIO: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
1er. SUPLENTE: DRA. CARMINA MONTIEL PACHECO
2° SUPLENTE: FRANCISCA MORAYNA GUTIÉRREZ LUNA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 102 del conjunto E de la Facultad de Química, UNAM.
Ciudad Universitaria, Ciudad de México.

Este trabajo se fue realizado gracias al financiamiento otorgado por la Facultad de Química con el Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (PAIP) 5000-9127 y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)-UNAM al proyecto IN 203017.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. J. Eleazar Martínez Barajas

SUSTENTANTE:

Axel Radilla Osorio

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias a los recursos otorgados por la DGPA (PAPIIT IN203017: Análisis de la removilización de reservas acumuladas en vainas de frutos de frijol y de la distribución de nutrientes entre las semillas de frutos de frijol sometidos a severas restricciones nutricionales) y la Facultad de Química (PAIP 5000 9127).

Abreviaturas y símbolos

°C	grados Celsius
µg	microgramos
µL	microlitros
BSA	albúmina sérica bovina
CaCl ₂	cloruro de calcio
cm ³	centímetros cúbicos
DAA	days after anthesis (días después de la antesis)
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
g	gramos
g	fuerza G (fuerza centrífuga relativa)
Gly	glicina
Ig	inmunoglobulina
kDa	kilodalton
MgCl ₂	cloruro de magnesio
M	molar
mA	miliampere
MES	ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
mg	miligramo
mM	milimolar
MOPS	ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico
NaCl	cloruro de sodio
PVDF	polivinildifloruro
SDS	dodecilsulfato sódico
T-20	Tween 20
TEMED	tetrametiletildiamina

ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 El frijol.....	2
1.1.1 Importancia y producción del frijol en México.....	2
1.2 La vaina	4
1.3 Almidón.....	6
1.3.1 Degradación del almidón	7
1.4 Amilasas	7
1.4.1 Clasificación, caracterización de su expresión y de su actividad.....	8
1.5 Condiciones adversas para el crecimiento de semillas	9
2. Antecedentes	10
3. Hipótesis y objetivos	11
4. Materiales y métodos	12
4.1 Germinación y cultivo de las plantas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	12
4.2 Recolección de vainas	13
4.3 Preparación de extractos	13
4.4 Determinación de la concentración de proteína	14
4.5 Geles de actividad	14
4.6 Western Blot	15
4.7 Medición de la actividad de α - y β -amilasas.....	17
4.7.1 Curva de actividad de α -amilasa.....	17
4.7.2 Medición de la actividad de α -amilasa en vainas de frutos de frijol ..	18
4.7.3 Determinación de la concentración de α -amilasas	19
4.7.4 Curva de actividad de β -amilasas	19
4.7.5 Medición de la actividad de β -amilasa en vainas de frutos de frijol ..	20

4.7.6 Determinación de la concentración de β -amilasas	20
4.8 Métodos bioinformáticos	20
5. Resultados y discusión	22
5.1 Evaluación de la actividad amilolítica	22
5.2 Medición de actividad amilolítica	24
5.3 Análisis electroforético de las proteínas presentes en las vainas	31
5.4 Detección por Western-Blot de α - y β -amilasas	34
5.5 Bioinformática	38
6. Conclusiones	46
7. Perspectivas	47
8. Referencias Bibliográficas	48

Resumen

El estrés por sequía es un factor limitante de la producción del frijol. Una alternativa para las regiones con este problema es la obtención de genotipos que al ser sometidos a condiciones extremas, sean capaces de reciclar eficientemente nutrientes acumulados en diferentes tejidos. Las vainas que protegen a las semillas acumulan cantidades importantes de almidón, y en el presente trabajo se emplearon técnicas bioquímicas para la caracterización de las enzimas involucradas en su degradación como respuesta a la deficiencia de nutrientes que los frutos experimentan cuando son cortados de la planta.

Para ello, a través de la electroforesis se determinó de manera cualitativa, si existe o no diferencia en la actividad amilolítica que se lleva a cabo en las vainas que se sometieron a estrés y las que no. Posteriormente, por espectrofotometría se midió de manera cuantitativa la actividad antes mencionada. Además, se realizaron ensayos para conocer la identidad de las enzimas involucradas en la hidrólisis de almidón, ya que estas podrían ser α - y β -amilasas. De manera adicional, se realizaron geles desnaturalizantes con el fin de observar el perfil proteínico de cada tipo de vaina.

Los resultados obtenidos indican que sí existe una relación entre los días bajo estrés al que se sometieron las vainas y la actividad amilolítica que se lleva a cabo en éstas. Las α - y β -amilasas son las principales responsables de dicha actividad; sin embargo, las cantidades de estas enzimas que hay por gramo de vaina no parecen ser diferentes en las vainas que fueron sometidas a estrés y las que no.

En conclusión podemos decir que en ausencia de nutrimentos las plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) inician un proceso bioquímico que les permite obtener recursos metabólicos para garantizar la supervivencia de la mayoría de las semillas.

1. Introducción

1.1 El frijol

1.1.1 Importancia y producción del frijol en México

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es una planta de ciclo anual que tiene origen en el continente americano, lo que se manifiesta en la riqueza genética de frijol en el área de México-Guatemala (Miranda, 1967). A nivel mundial, el consumo de frijol representa el 50% del consumo de leguminosas (Broughton *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 2003) y en algunos países de Centro y Sudamérica constituye la principal fuente de las proteínas presentes en la dieta (Hernández, 2007).

México es uno de los principales países productores y consumidores de este cultivo. El consumo anual per cápita fue de 8.4 kg en 2016 (FIRA, 2016) y representa el 36% de ingesta diaria de proteína (Lara, 2015). El frijol es producido en los 32 estados del país, siendo Zacatecas el estado con mayor producción, seguido de Durango, Sinaloa, Chihuahua y Chiapas, que en conjunto representan el 71.4% de la producción nacional (Sagarpa, 2017). De 2002 a 2012 se sembraron en promedio 1.8 mha (millones de hectáreas), de los cuales se cosecharon 1.5 mha (Lara, 2015). La superficie agrícola de México se divide en zonas de riego y de temporal. Las primeras se caracterizan por el uso de cantidades importantes de agua, requieren de grandes inversiones económicas y tienen, en general, un desarrollo técnico avanzado. Por su parte, en las zonas de temporal la disponibilidad de agua está limitada a la precipitación pluvial, son poco tecnificadas y por lo general se obtienen bajos rendimientos.

En México una parte muy importante del cultivo de frijol se establece en zonas de temporal y la sequía es la principal causa de los bajos rendimientos (Cuellar *et al.*, 2008).

1.1.2 Desarrollo de semillas de frijol

Poco después de que son fecundadas, la corola de las flores de la planta de frijol se marchita e inicia el crecimiento de la vaina (Figura 1). Ésta comienza a alargarse y una vez que alcanza su punto máximo, inicia el crecimiento de las semillas.



Figura 1. Planta de frijol con: flores (A), flores marchitas (B) y vainas (C).

En el ovario ocurren transformaciones progresivas para producir un fruto maduro, las cuales implican una interacción compleja de cambios bioquímicos, moleculares y estructurales coordinados temporal y espacialmente (Matilla, 2008). La semilla es producto de esta cascada de procesos y representa la culminación de la evolución reproductiva de las plantas (Matilla, 2008).

En leguminosas, desde el momento en que aparece la flor hasta que la semilla entra en dormancia pueden transcurrir 120 días. A lo largo de ese periodo pueden distinguirse varias etapas (Figura 2): inmediatamente después de la fecundación, en ella se inicia un proceso muy activo de división y diferenciación

celular que culmina con la formación del eje embrionario, cotiledones y endospermo.

El crecimiento del embrión se limita a esta primera etapa y se encuentra sometido a un control por parte de los tejidos maternos (Matilla, 2008).

Aproximadamente a partir del día 20 después de la floración, inicia la acumulación masiva de almidón y proteínas en la semilla (Figura 2), que serán usadas durante la germinación para la formación exitosa de una nueva planta.

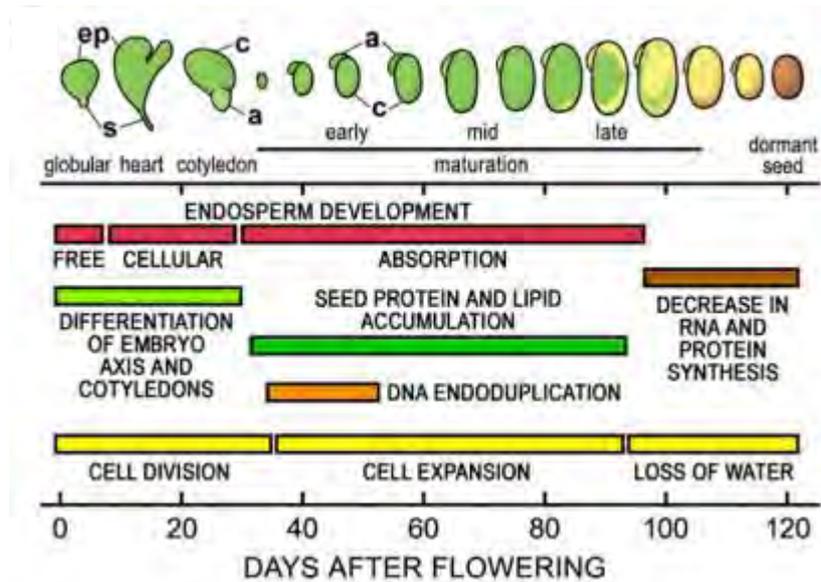


Figura 2. Representación esquemática del desarrollo de una semilla de frijol de soja. Imagen modificada de Le *et al.*, 2007.

1.2 La vaina

Botánicamente, el fruto de la planta de frijol es una vaina y esta característica es importante para clasificar a esta especie como una leguminosa. Las vainas poseen dos valvas las cuales se unen a través de dos suturas (placental y ventral). Los óvulos, que son las futuras semillas, se alternan en la sutura placental (Figura 3).

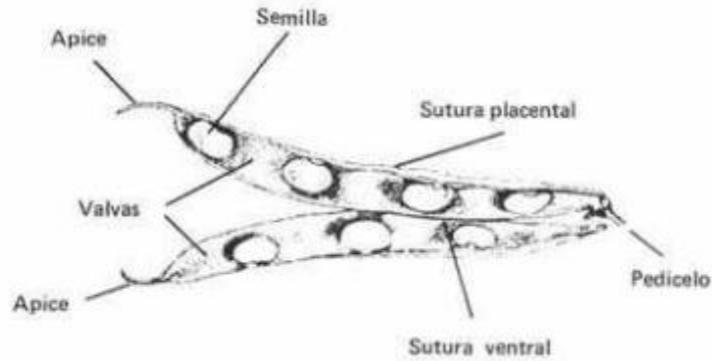


Figura 3. Esquema del fruto de la planta de frijol. Tomada de Debouck e Hidalgo (1985).

Si bien la vaina no es esencial para la existencia de un individuo, juega un papel primordial en la supervivencia de una especie (Bennett *et al.*, 2011).

Ésta encapsula a las semillas en desarrollo y las protege del ataque de plagas y patógenos (Bennett *et al.*, 2011). Además de esta función protectora, la pared de la vaina es fotosintéticamente activa y aporta nutrimentos que favorecen el crecimiento de la semilla (Bennett *et al.*, 2011). En trabajos recientes se ha revelado que la vaina origina señales que pueden contribuir a coordinar el llenado de granos y regular la reasignación de los recursos metabólicos destinados a semillas dañadas a aquellas que han conservado la viabilidad (Bennett *et al.*, 2011).

La vaina está formada químicamente por: agua, redes de celulosa y polímeros de pectina, proteínas (estructurales y enzimas), almidón y monosácaridos (Stolle *et al.*, 1999).

Las vainas tienen la capacidad de acumular cantidades importantes de almidón (Oliker *et al.*, 1978). Se ha observado que en las vainas de genotipos que se distinguen por tener alta capacidad para tolerar la sequía, es mayor esta capacidad (Cuellar *et al.*, 2008).

1.3 Almidón

El almidón es un polisacárido constituido por monómeros de glucosa unidos mediante enlaces α -1,4 y α -1,6; constituye la principal fuente de hidratos de carbono para humanos y animales domésticos (Blennow *et al.*, 2002).

En las plantas, el almidón y la sacarosa son los productos más importantes de la fotosíntesis (Stitt *et al.*, 2010). El primero es utilizado en plantas superiores para almacenar temporalmente energía en hojas y vainas; mientras que la sacarosa es la forma como se distribuyen en la planta los fotosintatos (Bernal, 2009).

La manera en la que se producen dichos compuestos se muestra en la Figura 4.

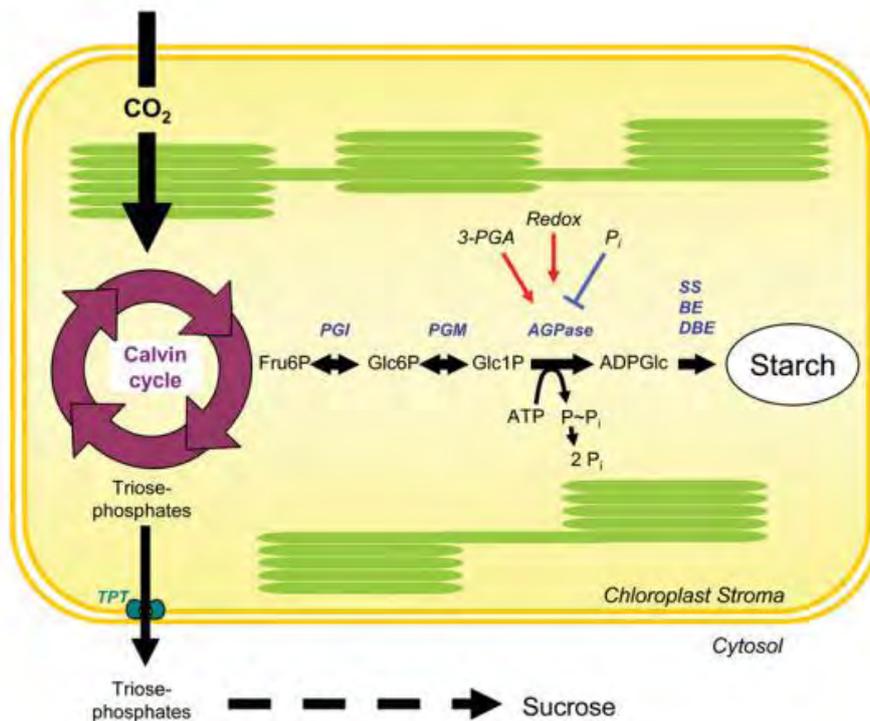


Figura 4. Síntesis de almidón y sacarosa en cloroplastos. Abreviaturas: Fru6P, fructosa-6-fosfato; Glc6P, glucosa-6-fosfato; Glc1P, glucosa-1-fosfato; TPT, translocador trios-fosfato/fosfato; PGI, fosfoglucosa isomerasa; PGM, fosfoglucomutasa; AGPasa, ADP glucosa pirofosforilasa; SS, almidón sintasa; BE, enzimas ramificadoras; DBE, enzimas desramificadoras. Tomada de Zeeman *et al.*, 2007.

1.3.1 Degradación del almidón

La degradación del almidón es un proceso que depende de la estructura del gránulo, de la participación de diversas enzimas y de su asociación de éstas con el gránulo (Bernal *et al.*, 2006).

Durante la noche, mientras no se lleva a cabo la fotosíntesis, el almidón que se almacenó en el día en los cloroplastos se degrada para proveer a la célula y a otros órganos de la planta, de carbono, energía y poder reductor (Bernal, 2009).

La degradación del almidón requiere de las actividades concertadas de enzimas que pertenecen a varias clases, entre ellas están las responsables de la fosforilación del gránulo como la GWD (por sus siglas en inglés, glucan water dikinase) y la PWD (por sus siglas en inglés, phosphoglucan wáter dikinase), que facilitan la hidrólisis de los enlaces α -1,4 por la β -amilasa para formar maltosa (Doyle *et al.*, 2007).

La evidencia actual sugiere que la importancia relativa de cada enzima puede variar entre especies y tejidos (Streb *et al.*, 2012). Por ejemplo en la germinación de cereales, la degradación del almidón es iniciada por α -amilasas. Por otro lado, la ruta principal de la degradación del almidón almacenado en los cloroplastos parece depender de la actividad de β -amilasas (Streb y Zeeman 2012).

1.4 Amilasas

Las amilasas son enzimas que llevan a cabo la hidrólisis de enlaces glicosídicos α -1,4 de polisacáridos tales como el almidón, dando como producto dextrinas de bajo peso molecular, maltosa y glucosa (Reyna *et al.*, 2004).

Estas enzimas son abundantes en la naturaleza y están presentes en algunas células animales, vegetales, bacterianas y fúngicas (Baldemar, 2002).

1.4.1 Clasificación, caracterización de su expresión y de su actividad

De acuerdo a la manera en que hidrolizan al almidón, las amilasas se clasifican en α -amilasas, β -amilasas, glucoamilasas y 1,6-glucosidasas; siendo las dos primeras las más abundantes (Baldemar, 2002).

Las α -amilasas (EC 3.2.1.1) son endoenzimas, es decir, hidrolizan enlaces internos de molécula de almidón. Actúan sin un orden determinado sobre las uniones α -1,4 glicosídicas, formando así dextrinas de bajo peso molecular (Baldemar, 2002), además, su actividad es dependiente de calcio.

Durante la germinación de la semilla de frijol, en las células de la capa de aleurona, se incrementan los niveles de Ca^{2+} libre, lo que facilita la secreción de enzimas hidrolíticas (Matilla, 2008). Por su parte, las giberelinas (GAs) inducen la síntesis y la posterior secreción de α -amilasa hacia el endospermo para iniciar la degradación del almidón (Matilla, 2008).

Existen reportes sobre la presencia de una α -amilasa que se acumula durante la senescencia de las hojas de *Arabidopsis thaliana* o en respuesta a estreses bióticos o abióticos. Debido a que dicha amilasa se expresa en los amiloplastos, se sugiere que puede degradar el almidón después de la muerte celular (Doyle *et al.*, 2007). Asimismo, en arroz se han encontrado grupos de α -amilasas que se expresan como respuesta a la baja concentración de sacarosa en algunos órganos vegetales (Chen *et al.*, 1994).

Por otro lado, las β -amilasas (EC 3.2.1.2) son exoenzimas, es decir, actúan sobre el sustrato a partir de la terminación no reductora de la cadena, hidrolizando los enlaces α -1,4 glicosídicos alternados y formando maltosa como producto principal (Baldemar, 2002).

Se sabe que la β -amilasa es la amilasa más abundante en tejidos fotosintéticos (Beers *et al.*, 1990) y que su participación en la degradación del almidón puede ser más importante que la de α -amilasa (Doyle *et al.*, 2007).

Se ha reportado que las α -amilasas y β -amilasas de microorganismos y de cereales como maíz y cebada poseen sitios de unión al almidón además del dominio catalítico (Bernal, 2009).

1.5 Condiciones adversas para el crecimiento de semillas

En diferentes especies de plantas la sequía afecta la relación entre el carbono contenido en las hojas y el canalizado a los órganos heterótrofos como las semillas y las raíces; indicando que los procesos de repartición de carbono son objetivos importantes de esta condición adversa (Nakano *et al.*, 2000).

En los tejidos fotosintéticos, el almidón transitorio se acumula en los cloroplastos durante el día y se degrada en la noche para proveer compuestos de carbono reducidos cuando no se lleva a cabo la fotosíntesis (Doyle, *et al.*, 2007), lo cual es importante para que las plantas puedan cumplir exitosamente su crecimiento y sus procesos reproductivos (Stitt *et al.*, 2007; Andriotis *et al.*, 2012; Stitt y Zeeman 2012).

El almidón también puede contribuir a mejorar la capacidad de los cultivos para enfrentar condiciones adversas. Por ello, es interesante mencionar que genotipos de frijol tolerantes al estrés por sequía se caracterizan por la acumulación elevada de almidón en las vainas (Cuellar *et al.*, 2008).

Generalmente las respuestas por parte de las plantas a condiciones ambientales adversas son altamente dependientes del genotipo, de la etapa de desarrollo, naturaleza, duración y severidad del estrés (Pessarakli, 2001).

Al remover las vainas de la planta se da una condición severa de estrés en dichas vainas, pues se interrumpe de manera total el suministro de nutrimentos, agua y minerales.

2. Antecedentes

Para la elaboración del presente proyecto se trabajó con las semillas de dos muestras comerciales de frijol diferentes, etiquetados internamente como genotipo 15 (G15) y genotipo OTI. Dichas muestras fueron otorgadas por el Dr. Eleazar Martínez Barajas, quien de manera conjunta con otros compañeros del laboratorio 102 del conjunto E, han trabajado anteriormente con estos genotipos.

3. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

El estrés nutricional que se genera en los frutos de frijol que son removidos de la planta, induce la expresión de amilasas responsables de la degradación del almidón que se acumula en los tejidos de la vaina.

Objetivo General

Evaluar el efecto de la falta de nutrimentos sobre la producción y actividad de amilasas en las vainas de los frutos de 2 diferentes genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris*).

Objetivos Particulares

- Germinar y cultivar plantas de frijol para la obtención de los frutos necesarios para realizar los experimentos.
- Evaluar la actividad amilolítica de los frutos removidos de las plantas y determinar si la falta de nutrientes induce cambios en la expresión de amilasas en las vainas de los frutos de frijol.
- Usar anticuerpos específicos para evaluar el efecto de la falta de nutrientes sobre la abundancia de proteínas con actividad de α o β -amilasas.
- Evaluar qué proporción de la actividad hidrolítica sobre el almidón corresponde a α y a β -amilasas.
- Investigar si hay diferencias en las respuestas de los 2 diferentes genotipos cuyos frutos son sometidos al estrés nutricional que resulta al cortarlos de la planta.

4. Materiales y métodos

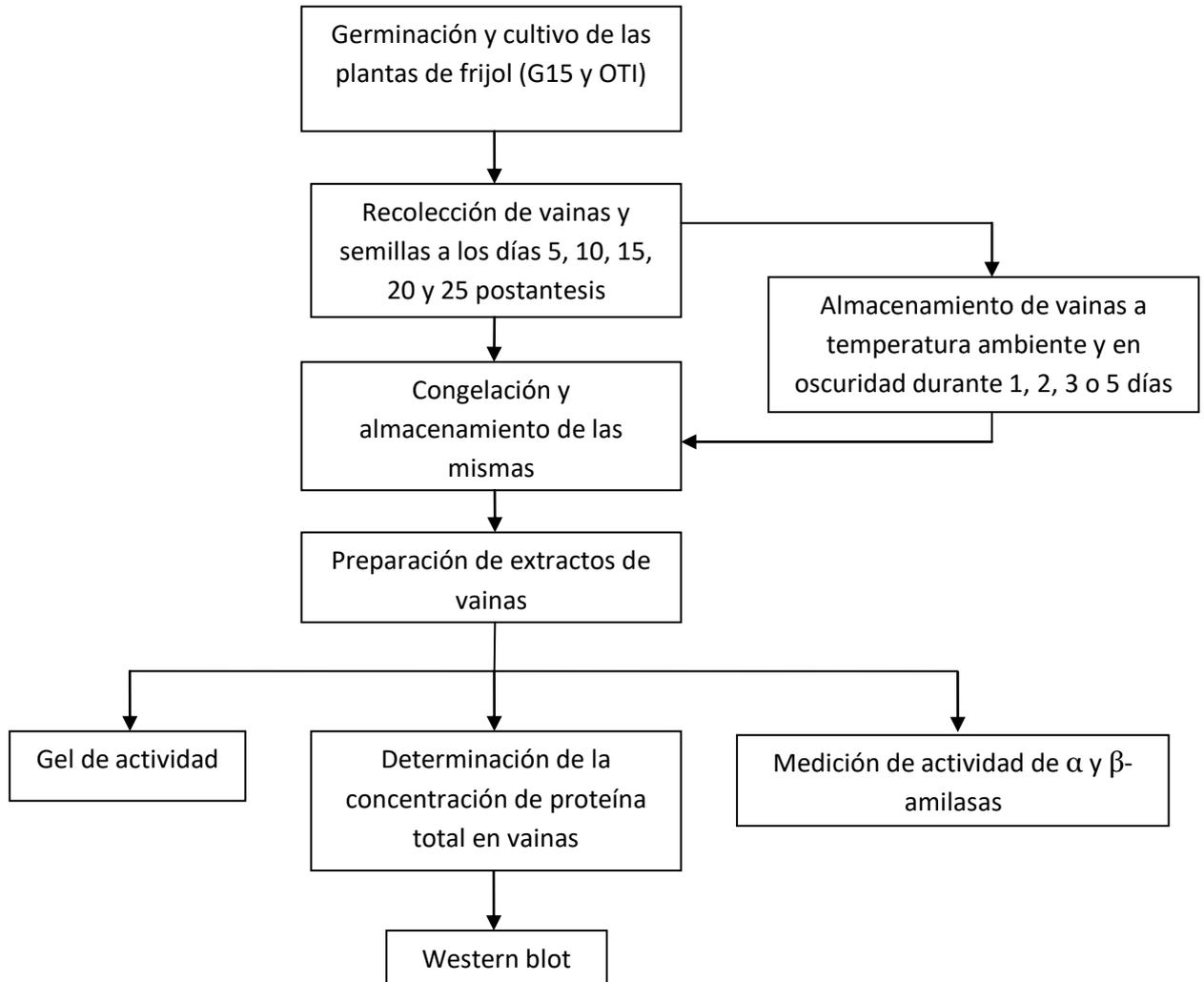


Figura 5. Esquema general de la metodología empleada para la realización del proyecto.

4.1 Germinación y cultivo de las plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Las semillas de los genotipos G15 y OTI se desinfectaron con etanol al 70% durante un minuto, después se lavaron cinco veces con agua destilada. Posteriormente se pusieron un minuto en una solución de hipoclorito de sodio

al 1% (v/v). Después de lavar exhaustivamente con agua destilada, se pusieron a germinar a temperatura ambiente (25°C) en papel humedecido con agua en oscuridad. Después de 3-4 días, las plántulas se trasplantaron a macetas que contenían 350 cm³ de agrolita. Las macetas se regaron todos los días alternando agua y solución nutritiva Miracle-Gro[®].

Las flores se marcaron el día en que abrieron y la edad de los frutos se estableció en días después de la antesis (DAA por sus siglas en inglés).

4.2 Recolección de vainas

Un grupo de frutos fueron removidos de la planta a diferentes DAA (5, 10, 15, 20 y 25), los cuales se separaron en vainas y semillas, siendo las primeras el material de trabajo. Otros frutos se cortaron al día 20 DAA y se incubaron en oscuridad por 1, 2, 3 o 5 días a temperatura ambiente (éstas se marcaron como 20+1, 20+2, 20+3 y 20+5, respectivamente). En ambos casos, terminando su respectivo tratamiento, las vainas se congelaron al instante con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C.

4.3 Preparación de extractos

Muestras de las vainas congeladas (aproximadamente 0.4 g) se molieron en un mortero con 1 mL de amortiguador de extracción: MOPS 100 mM (pH 7.2), EDTA 1 mM, DTT 1 mM y etilenglicol al 10%. La mezcla resultante fue vaciada en un tubo eppendorf de 1.6 mL de capacidad y se centrifugó a 13 800 g durante 5 minutos.

4.4 Determinación de la concentración de proteína

Los sobrenadantes obtenidos del paso anterior, se usaron para medir la cantidad de proteína por medio de la técnica de Bradford. Se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) para realizar una curva patrón (0-20 µg). Una vez conocida la cantidad de proteína presente en el sobrenadante de los extractos, se hicieron los cálculos pertinentes para cargar la misma cantidad de proteína en los diferentes pozos del gel.

4.5 Geles de actividad (Stanley *et al.*, 2011; Seung *et al.*, 2013)

Para observar la actividad amilolítica presente en los extractos de las vainas, se realizaron geles nativos de acrilamida adicionados con amilopectina como sustrato para las amilasas. Se puso el volumen de extracto que tuviera 100 µg de proteína en un volumen final de 100 µL, de los cuales 25 µL corresponden a amortiguador de carga 4X (por cada 10 mL de amortiguador: 4.96 mL de TRIS-HCl 0.5 M (pH 6.8), 4.0 mL de glicerol, 0.5 mL de DTT 1 M, 5 mg de azul de bromofenol y 0.54 mL de H₂O) y el volumen faltante se cubrió con amortiguador de extracción. Dada la intensidad de la señal, fue necesario diluir 1:15 la muestra anterior.

La composición del gel separador fue la siguiente: 1.25 mL acrilamida 30:08 (acrilamida:bisacrilamida), 0.625 mL de amortiguador TRIS-HCl 3M (pH 8.8), 10 mg de amilopectina de papa, 10% de glicerina, 2 µL de CaCl₂ 100 mM, 5 µL de MgCl₂ 100 mM, 2.625 mL de H₂O, 5 µL de tetrametiletilendiamina (TEMED), 75 µL de persulfato de amonio al 10%. Para preparar el gel apilador se mezclaron 0.31 mL de acrilamida 30:08, 0.62 mL de amortiguador TRIS-HCl 0.5 M (pH 6.8), 1.52 mL de H₂O, 5 µL de TEMED, 30 µL de persulfato de amonio al 10%. La composición del amortiguador de corrida fue la siguiente: 50 mM TRIS-base (pH 8.4) y 384 mM de glicina. Los pozos de los geles se cargaron con 5µL de muestra. Después de varios experimentos se logró determinar que las condiciones que permitían la obtención de los resultados más claros son las

siguientes: aplicar 100 V durante el tiempo necesario para que el frente de corrida salga del gel (aproximadamente 4 h), y después 2 h adicionales. Para evitar el calentamiento, la cámara de electroforesis se colocó en baño de hielo. Una vez que terminó la electroforesis, el gel se colocó en un recipiente de plástico con 50 mL de amortiguador de incubación [100 mM MES (pH 5.8), MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1mM y DTT 1 mM) y se mantuvo en agitación orbital a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente el gel se tiñó con lugol. La amilopectina se tiñe de color azul intenso y las regiones en donde hubo una actividad amilolítica que la degradó se ven de un color más claro.

4.6 Western Blot

Para establecer la identidad de las enzimas cuya actividad amilolítica fue observada en los geles nativos, se realizaron inmunodetecciones con anticuerpos comerciales específicos para α - y/o β -amilasas.

Para la preparación de las muestras en este caso se usó un amortiguador de carga 4X desnaturalizante [por cada 10mL de amortiguador: 4.96 mL de TRIS-HCl 0.5 M (pH 6.8), 4.0 mL de glicerol, 0.5 mL de DTT 1 M, 5 mg de azul de bromofenol y 0.8 g de SDS]. Antes de ser analizadas, las muestras se calentaron a 80°C por 10 minutos. La composición de los geles fue muy similar entre sí, pero debe destacarse que para preparar el gel separador se eliminó la amilopectina y se agregaron 25 μ l de una solución de SDS al 20%. Una proporción similar de SDS se incluyó en el gel apilador. Los pozos se cargaron con 5 μ L de marcadores de peso molecular y de 10 μ L de las muestras. Posteriormente éste fue corrido con 300 mL de amortiguador de corrida 1X [2X: 50 mM de TRIS-base (pH 8.4), 384 mM de Gly, 0.2% SDS, pH 8.5] a 100V durante el tiempo necesario para que el colorante indicador del frente de corrida alcance el extremo del gel (2 h aproximadamente). Un gel se tiñó con azul de Coomassie y otro se colocó en un recipiente de plástico con amortiguador de transferencia 1X (25 mM TRIS-HCl, 52 mM Gly, 20% Metanol, pH 8.3). Simultáneamente las membranas de PVDF se hidrataron con metanol y se colocaron también en amortiguador de transferencia.

En un dispositivo especial se preparó un emparedado de transferencia de la siguiente manera: esponja, papel filtro, gel, membrana, papel filtro y esponja; cada uno de ellos humedecidos previamente en amortiguador de transferencia. El emparedado fue colocado dentro de un electrodo de transferencia, teniendo especial cuidado que la membrana de PVDF quede del lado en donde se encuentra el polo positivo. La cámara de transferencia tiene un espacio para colocar un bloque de hielo, necesario para evitar que se caliente el gel. La cámara fue llenada con amortiguador de transferencia y se coloca encima de un agitador magnético. Se aplica una corriente eléctrica de 30 mA durante 90 minutos con agitación. Una vez terminada la transferencia, se recuperó la membrana y se colocó en un recipiente de plástico, donde se le añadió también 20 mL de una solución de leche en polvo comercial baja en grasa al 2% (p/v) en amortiguador TBST 1X (2 L 4X: 19.36 g de TRIS-base, 64 g de NaCl, 8 mL de T-20, pH 7.6). Se dejó 1h sobre un agitador orbital; logrando de esta manera un bloqueo de los lugares a los que el anticuerpo podría unirse de manera no específica. Después, se retiró la solución de leche y fue añadido el anticuerpo primario en diluciones 1:5000 para α -amilasa y 1:7500 para β -amilasa disueltos en soluciones de leche de la misma composición que la empleada para el bloqueo, dejándolo durante la noche a 4°C sobre un agitador orbital.

Al día siguiente se le hicieron 3 lavados de 15 minutos con amortiguador TBST 1X utilizando nuevamente el agitador orbital. Posteriormente, se colocó el anticuerpo secundario que contiene a la enzima peroxidasa (Ig de conejo) disuelto en amortiguador TBST 1X en una relación de 2 μ L por cada 40mL de amortiguador, y se le añadieron 20 mL a la membrana, los cuales se le dejan en agitación por 1 h. Seguido a esto se hicieron otros 3 lavados de 15 minutos con amortiguador TBST 1X.

Por último, la membrana fue llevada al equipo ChemiDoc[®] donde se le añadió 1 mL de la mezcla de los reactivos Immobilon[™] Western, y se llevó a cabo el revelado. El programa de computadora arroja 1 foto cada 4 segundos durante 1 minuto, dando un total de 15 imágenes, de las cuales se seleccionó la que fue considerada mejor. Este procedimiento se realizó para α y β -amilasas en muestras de ambos genotipos de frijol.

4.7 Medición de la actividad de α - y β -amilasas

Para la evaluación de la actividad de α - y β -amilasas presentes en las muestras de vainas de frijol de los genotipos 15 y OTI, se emplearon los reactivos y la metodología descrita por © Megazyme International.

Para establecer las condiciones óptimas de ensayo se hicieron curvas de actividad de α y β -amilasas, empleando el extracto de 2 muestras de vainas para cada caso. Siendo 20 DAA y 20+5 las muestras utilizadas en el caso de α -amilasas, y 20 DAA y 20+3 en el caso de β -amilasas.

4.7.1 Curva de actividad de α -amilasa

Se pesaron aproximadamente 0.2 g de vaina y se homogenizaron con 1 mL de amortiguador de extracción (dilución 50:1000 mL del bote 3 incluido en el kit Ceralpha[®]). El macerado se colocó en un microtubo de 1.6 mL de capacidad. Los tubos se agitaron en el vórtex durante 20 segundos y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 1 000 g durante 10 minutos.

Se usaron tubos nuevos para hacer las mezclas que se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Reactivos por tubo para realizar el ensayo de relación entre el volumen de extracto y la absorbancia.

Tubo	V extracto (μ L)	Amortiguador de extracción (μ L)
1	10	40
2	20	30
3	30	20
4	40	10
5	50	0

Se pre-incubaron a 40°C por 5 minutos 550 µL del sustrato Ceralpha® (bote 2 del kit de mismo nombre) y los tubos con las muestras.

Posteriormente, se agregaron 50 µL de sustrato Ceralpha® a cada uno de los tubos que contienen las muestras, se agitaron levemente y se incubaron a 40°C por 10 minutos más.

Una vez transcurrido el tiempo, se detiene la reacción agregando solución *stop* para α-amilasa [TRIS-base 20% (m/v), pH 9].

Por último, se determinó la absorbancia a 405 nm de cada uno de los tubos, utilizando una mezcla de amortiguadores (50 µL amortiguador de extracción + 750 µL de solución *stop*) como blanco.

4.7.2 Medición de la actividad de α-amilasa en vainas de frutos de frijol

Se pesaron 0.2 g de muestra y se molió con 1 mL de amortiguador de extracción. El macerado se colocó en tubos eppendorf de 1.6 mL y se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 1 000 g durante 10 minutos.

Se colocaron 50 µL del sobrenadante de cada muestra a otros microtubos, los cuales se pre-incubaron a 40°C durante 5 minutos, al igual que 550 µL del sustrato Ceralpha®.

Se tomaron alícuotas de 50 µL del sustrato pre-incubado y se depositaron en cada uno de los tubos también pre-incubados. Una vez mezclados fueron incubados a 40°C por 10 minutos más. Una vez transcurrido este tiempo, la reacción fue detenida agregando 750 µL de solución *stop* para α-amilasa.

Para determinar la actividad se midió la absorbancia de cada una de las muestras, a 405 nm.

4.7.3 Determinación de la concentración de α -amilasas

La cantidad de proteína de las muestras se determinó por el método de Bradford después de que los extractos fueron centrifugados.

4.7.4 Curva de actividad de β -amilasas

También se usaron 0.2 g de tejido de vaina, los cuales se molieron con 1 mL de amortiguador de extracción (1 mL del bote 2 incluido en el kit Betamyl[®], 0.352 g de cisteína HCl incluida en el bote 4 del kit, 18 mL de H₂O desionizada, pH ajustado a 8.0). Se dejó incubar por 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 2 000 g durante 10 minutos. Una vez concluido este tiempo, se tomaron 100 μ L del sobrenadante y se mezclaron con 1 mL de amortiguador de dilución (4.8 mL del bote 3 Betamyl[®] aforados a 50 mL con H₂O desionizada).

Para establecer las condiciones óptimas de ensayo, se midió la actividad en mezclas como las que se indican en la Tabla 1.

En un tubo eppendorff se colocaron 550 μ L de la solución sustrato Betamyl-3[®] y se pre-incubaron a 40°C durante 5 minutos junto con los tubos descritos en la Tabla 1. Terminado este tiempo, se colocó en cada tubo 50 μ L del sustrato pre-incubado y se incubaron a 40°C por 10 minutos más.

Una vez transcurrido el tiempo, la reacción fue detenida con 750 μ L de solución *stop* para β -amilasa [TRIS-base 1% (m/v), pH 8.5].

Se leyó la absorbancia de las muestras a 405 nm, empleando una mezcla de amortiguadores (50 μ L amortiguador de extracción + 750 μ L de solución *stop*) como blanco.

4.7.5 Medición de la actividad de β -amilasa en vainas de frutos de frijol

Se pesaron 0.2 g de muestra y se molió con 1 mL de amortiguador de extracción (descrito en la realización de la curva patrón). El extracto se colocó en tubos eppendorff de 1.6 mL y se dejó incubar a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente se centrifugaron a 2 000 g durante 10 minutos.

Se tomaron 100 μ L del sobrenadante y se mezclaron en otro tubo eppendorff con 1 mL de amortiguador de dilución (descrito en la metodología de la curva de actividad). Se tomaron 50 μ L de las muestras diluidas y se colocaron en otros microtubos que se pre-incubaron junto con otro tubo que contenía 550 μ L del sustrato Betamyl-3[®] a 40°C durante 5 minutos.

Pasado ese tiempo, a los tubos con las muestras diluidas se les agregaron 50 μ L del sustrato pre-incubado y se incubaron a 40°C por 10 minutos. La reacción es detenida una vez transcurrido este tiempo agregando 750 μ L de solución *stop* para β -amilasa.

Se colocaron 300 μ L de cada muestra en una celda y se midió la absorbancia a 405 nm, empleando agua desionizada como blanco.

4.7.6 Determinación de la concentración de β -amilasas

La cantidad de proteína presente en el sobrenadante de los extractos también se cuantificó por el método de Bradford.

4.8 Métodos bioinformáticos

Se realizó una búsqueda en bases de datos sobre la localización, secuencia de aminoácidos e isoformas de las amilasas de origen vegetal, específicamente de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*), con ello, se intentó entender el funcionamiento dentro de la planta y su actividad biológica.

En la página de Phytozome se encontraron, reportadas para esta especie tres α -amilasas y ocho β -amilasas. Se procedió a la identificación de las secuencias de aminoácidos de estas enzimas, así como su ubicación predominante en la planta.

Posteriormente, mediante una Alineación de Secuencia Múltiple en Clustal Omega, se determinó el porcentaje de identidad que existe en la estructura primaria de cada una de ellas, comparando las amilasas de la misma clasificación, lo cual nos da una idea de la variedad de isoformas que pueden existir en plantas de frijol.

Con las secuencias de aminoácidos obtenidas de Phytozome, fue posible determinar el peso molecular aproximado de las amilasas allí descritas con ayuda de la herramienta que ofrece Bioinformatics.org.

5. Resultados y discusión

5.1 Evaluación de la actividad amilolítica

En las Figuras 6 y 7 pueden observarse los resultados de la degradación del almidón en geles nativos de acrilamida por los extractos de vainas de frijol de los genotipos OTI y G15, respectivamente.

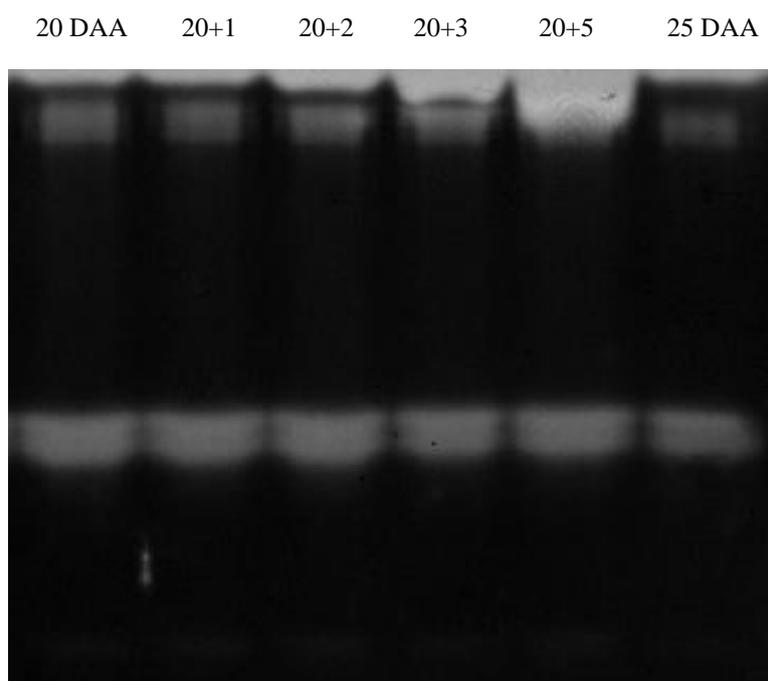


Figura 6. Análisis en gel de acrilamida de la actividad amilolítica de las enzimas presentes en vainas de frijol del genotipo OTI. Los extractos corresponden a las vainas que se cortaron a 20 y 25 DAA (sin tratamiento de estrés) y a las vainas que se cortaron a 20 DAA y se incubaron por 1 (20+1), 2 (20+2), 3 (20+3) y 5 (20+5) días. En cada pozo se cargó el mismo volumen de extracto.

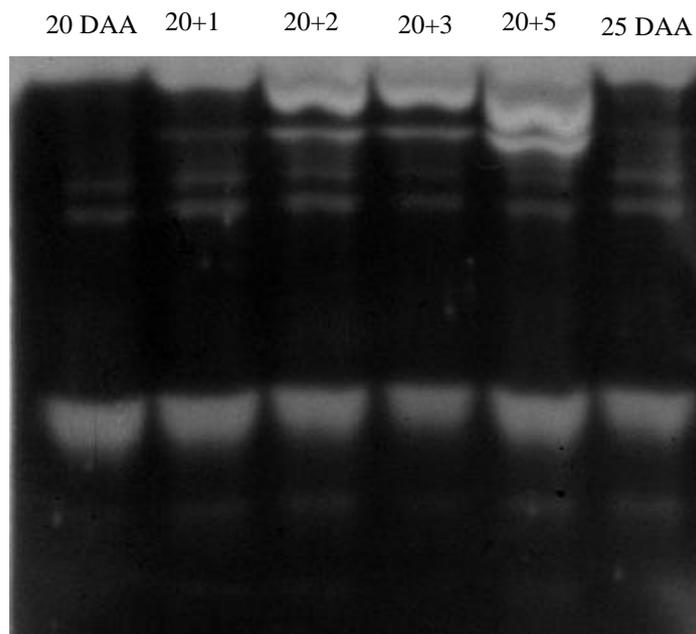


Figura 7. Análisis en gel de acrilamida de la actividad amilolítica de las enzimas presentes en vainas de frijol del genotipo 15. Los extractos corresponden a las vainas que se cortaron a 20 y 25 DAA (sin tratamiento de estrés) y a las vainas que se cortaron a 20 DAA y se incubaron por 1 (20+1), 2 (20+2), 3 (20+3) y 5 (20+5) días. En cada pozo se cargó el mismo volumen de extracto.

Las bandas que logran observarse en el gel se deben a la presencia de proteínas con actividad amilolítica. Como puede observarse en la Figura 6, en los extractos del genotipo OTI el desarrollo (muestras de 20 y 25 DAA) disminuye ligeramente el perfil de las proteínas con actividad amilolítica, sin embargo, la falta de nutrimentos produce un incremento gradual en la intensidad de la banda superior.

En el caso del genotipo 15, también muestra una ligera disminución de las bandas detectadas atribuibles al desarrollo (muestras correspondientes a los días 20 y 25 DAA, Figura 7), y la falta de nutrientes produjo un aumento gradual en la intensidad de las diferentes bandas, el cual corresponde a una mayor actividad amilolítica. Dicho aumento se hace especialmente evidente en

la muestra 20+5. Esto sugiere que, al remover las vainas se produce un incremento en la actividad de las amilasas.

Al comparar ambos geles (Figuras 6 y 7), se nota que en los dos genotipos hay un comportamiento similar en el efecto del tiempo sobre las señales de las bandas; así como que en G15 se observan un mayor número de bandas que en OTI, lo cual sugiere una mayor actividad y probablemente un mayor número de isoenzimas. Cabe mencionar que las proteínas en el gel se separan según su carga y su peso molecular, aunque no es posible identificar ninguno de ellos en este gel.

En otras plantas y granos se han observado resultados similares. En arroz se encontró que el agotamiento de azúcares regula la expresión de α -amilasa, el metabolismo de carbohidratos así como otros cambios fisiológicos y celulares (Chen *et al.*, 1994). Doyle *et al.* (2007) ha reportado resultados parecidos en Arabidopsis.

Análisis realizados en nuestro laboratorio muestran que las vainas del genotipo 15 acumulan poco almidón, mientras que las del genotipo OTI acumulan cantidades muy superiores. Los resultados de este trabajo sugieren que la degradación del almidón en las vainas del genotipo 15 podría ser más efectiva dada su capacidad para inducir una gama más amplia de enzimas con actividad amilolítica en respuesta a la falta de nutrientes. Esta situación podría contribuir a que la acumulación de almidón en un momento dado, en las vainas del genotipo 15 sea menor.

5.2 Medición de actividad amilolítica

Con el fin de establecer las diferencias del volumen en la actividad de α -amilasa y β -amilasa, se utilizaron algunos extractos para investigar el efecto de la cantidad de muestra sobre las actividades enzimáticas.

Las cuatro Figuras siguientes (8, 9, 10 y 11) muestran una relación directa entre el volumen de muestra empleado y la absorbancia leída, la cual está

relacionada con la actividad amilolítica. A su vez, un volumen mayor de extracto implica un mayor número de amilasas, quienes se encargan de dicha actividad.

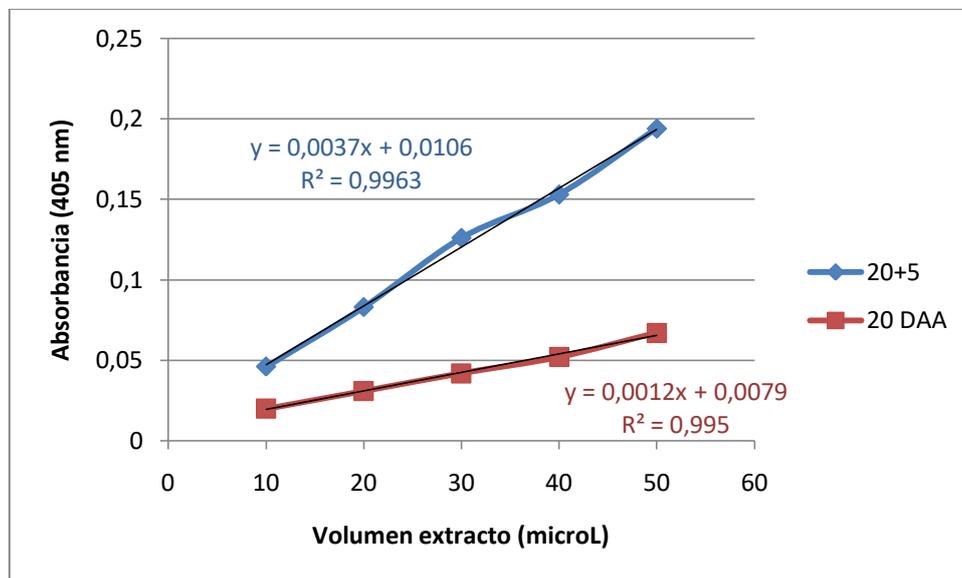


Figura 8. Efecto del volumen de extracto sobre la actividad de α -amilasa en extractos de vainas de 20 DAA y 20+5 del genotipo 15. Los extractos corresponden a las vainas que se cortaron a 20 DAA (sin tratamiento de estrés) y a las vainas que se cortaron a 20 DAA y se incubaron 5 días (20+5).

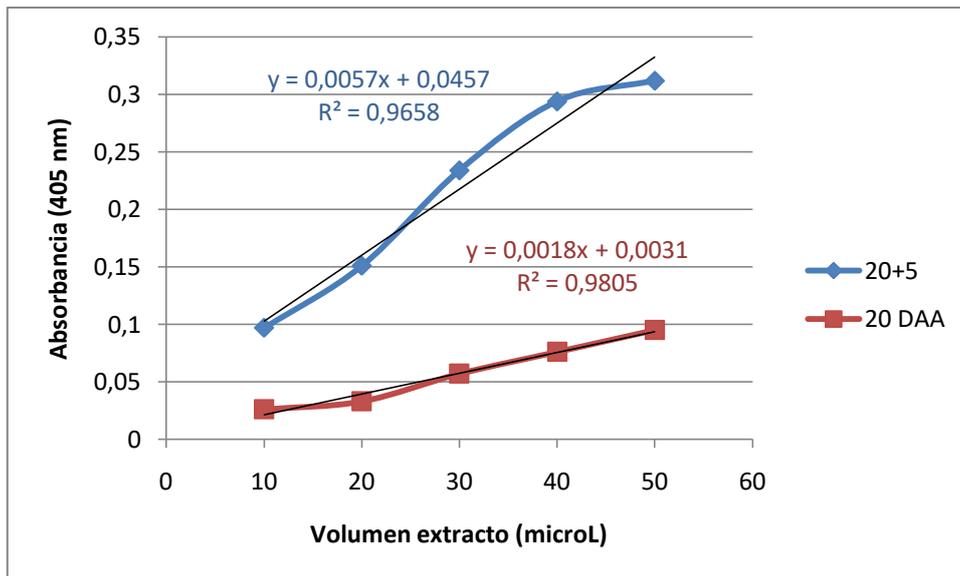


Figura 9. Efecto del volumen de extracto sobre la actividad de α -amilasa en extractos de vainas de 20 DAA y 20+5 del genotipo OTI. Los extractos corresponden a las vainas que se cortaron a 20 DAA (sin tratamiento de estrés) y a las vainas que se cortaron a 20 DAA y se incubaron 5 días (20+5).

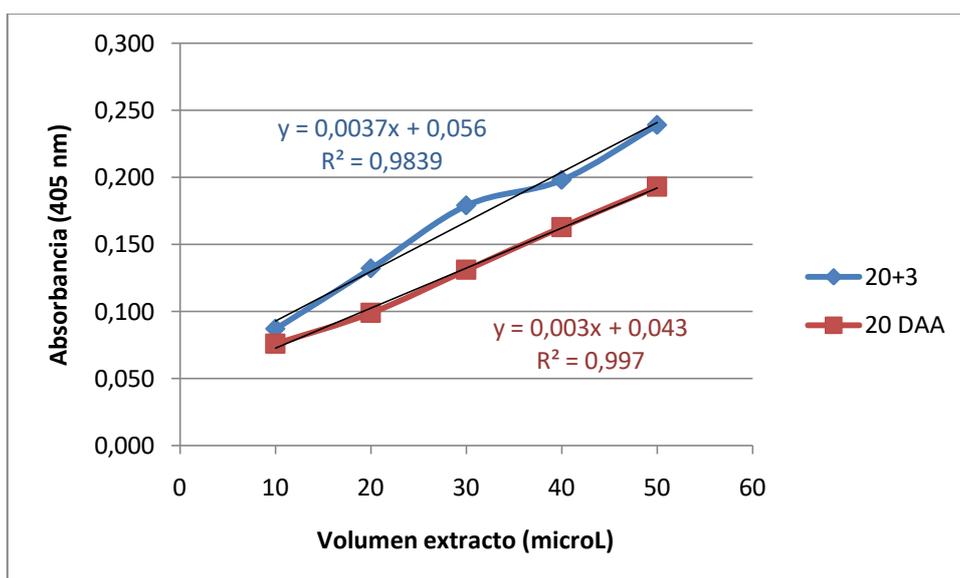


Figura 10. Efecto del volumen de extracto sobre la actividad de β -amilasa en extractos de vainas de 20 DAA y 20+3 del genotipo 15. Los extractos corresponden a las vainas que se cortaron a 20 DAA (sin tratamiento de estrés) y a las vainas que se cortaron a 20 DAA y se incubaron 3 días (20+3).

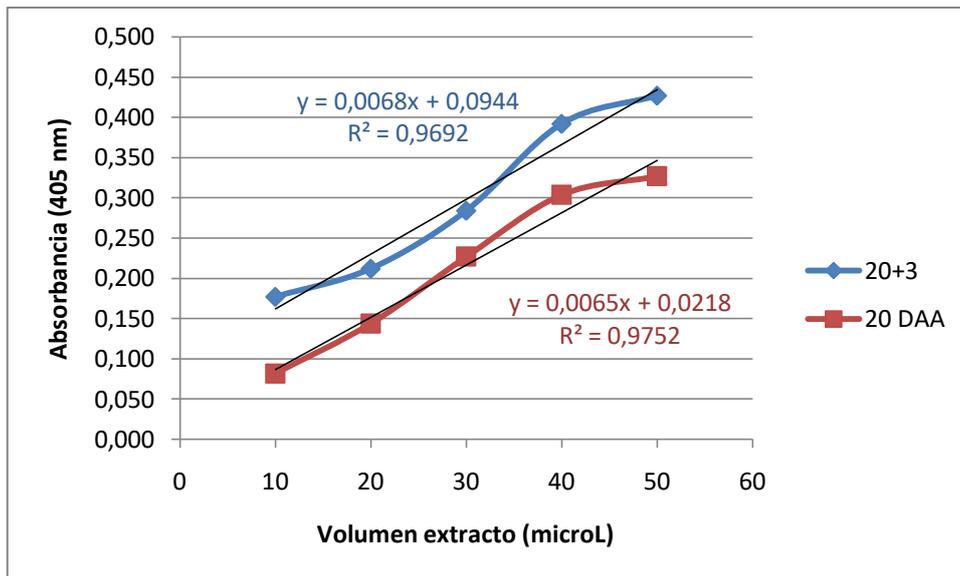


Figura 11. Efecto del volumen de extracto sobre la actividad de β -amilasa en extractos de vainas de 20 DAA y 20+3 del genotipo OTI. Los extractos corresponden a las vainas que se cortaron a 20 DAA (sin tratamiento de estrés) y a las vainas que se cortaron a 20 DAA y se incubaron 3 días (20+3).

La tendencia de estas curvas es similar a lo que se observó en los geles nativos, pues la actividad amilolítica es mayor en muestras sometidas a estrés respecto a aquellas que no fueron sometidas. En el caso de OTI, tanto para α -amilasa (Figura 9) como para β -amilasa (Figura 11), el efecto del volumen sobre la actividad no fue lineal; esto probablemente se debe a que las amilasas en este genotipo alcancen su actividad máxima de manera más pronta.

En la Figura 12 pueden observarse los valores de actividad de α -amilasa expresados por gramo de vaina de ambos genotipos, en ellos se aprecia que la falta de nutrimentos a la que se sometieron las vainas de los frutos que fueron removidos de las plantas induce un aumento en la actividad, siendo en G15, la muestra 20+3 en donde se aprecia la mayor capacidad de hidrólisis del almidón.

En esta, misma figura puede observarse que la actividad de α -amilasa expresada por gramo de vaina en el genotipo OTI, también se incrementa en las vainas que fueron removidas. En este caso, el valor más alto se observó en la muestra 20+5.

Dados los valores de incertidumbre en las muestras, no se puede decir con exactitud qué genotipo ofreció la mayor actividad, sin embargo, pareciera ser que fue en G15.

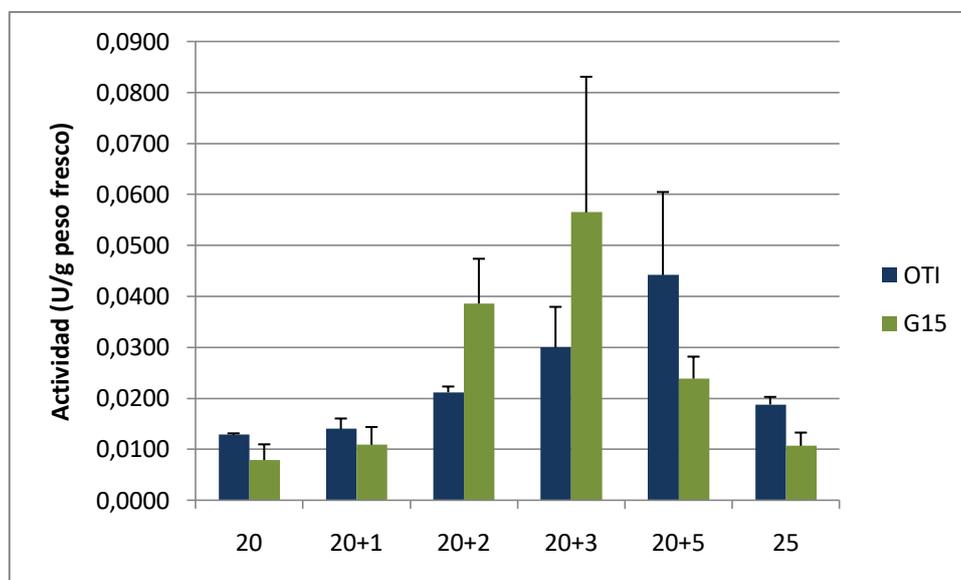


Figura 12. Actividad de α -amilasa por gramo de vaina en muestras de los genotipos 15 y OTI. Los extractos corresponden a las vainas que se cortaron a 20 y 25 DAA (sin tratamiento de estrés) y a las vainas que se cortaron a 20 DAA y se incubaron por 1 (20+1), 2 (20+2), 3 (20+3) y 5 (20+5) días.

Dado que los frutos que son removidos de la planta sufren un grado de deshidratación que puede ser importante, la actividad también se expresó en función de la cantidad de proteína presente (actividad específica).

La actividad expresada de esta manera se presenta en la Figura 13. La forma en que se expresaron los resultados no produjo cambios importantes en la distribución de la actividad, e independientemente del modo en que se exprese la actividad, el valor más bajo se observó en la de 20 DAA para ambos genotipos.

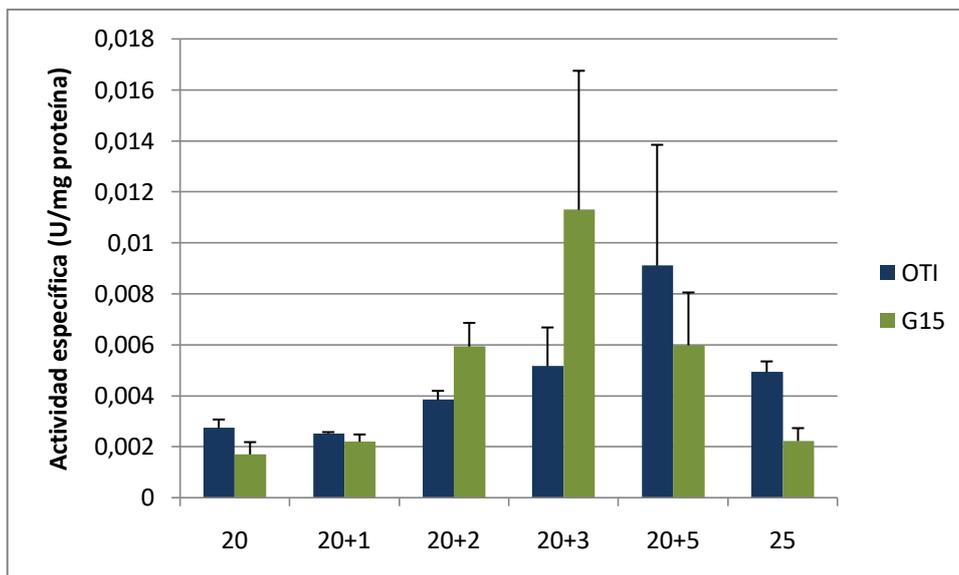


Figura 13. Actividad específica de α -amilasa en muestras de los genotipos 15 y OTI. Los extractos corresponden a las vainas que se cortaron a 20 y 25 DAA (sin tratamiento de estrés) y a las vainas que se cortaron a 20 DAA y se incubaron por 1 (20+1), 2 (20+2), 3 (20+3) y 5 (20+5) días.

En ambos casos puede observarse un patrón donde la actividad aumenta conforme al número de días después de que los frutos fueron cortados, lo cual refuerza la suposición de que el estrés nutricional promueve la síntesis de enzimas amilolíticas.

La diferencia de actividad entre genotipos fue variable pues resultó mayor para G15 en algunos casos y para OTI en otros. Las muestras en OTI señalan un patrón de crecimiento entre actividad y número de días rezagados, quedando de manera tentativa 20+5 como la muestra donde hubo mayor actividad, seguido de las muestras 25 DAA y 20+3.

Por su parte, las muestras en G15 señalan un crecimiento y posteriormente un decaimiento de la actividad respecto al número de días rezagados, siendo de manera tentativa la muestra 20+3 donde hubo la mayor actividad, seguido de 20+5 y 20+2.

En ambos genotipos la muestra 25 DAA presenta mayor actividad que la muestra 20 DAA, a diferencia de lo observado en los geles nativos.

En la Figura 14 se presentan los resultados de actividad correspondiente a β -amilasa expresada por gramo de vaina. En el caso del genotipo 15 los cambios no son muy grandes. En el caso de las muestras del genotipo OTI los cambios son más evidentes y se aprecia un aumento gradual de la actividad, de tal manera que la observada en la muestra 20+5 es claramente superior a las demás.

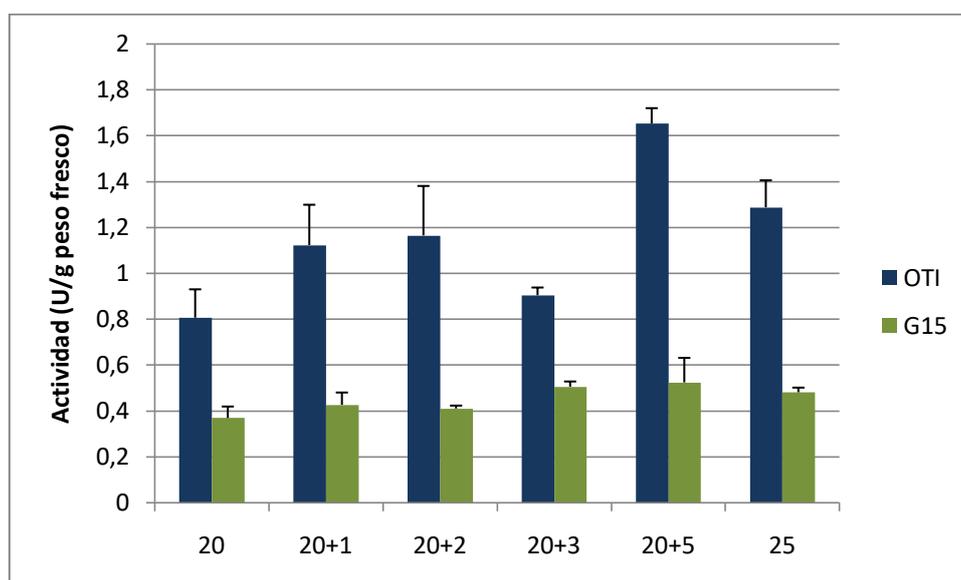


Figura 14. Actividad de β -amilasa por gramo de vaina en muestras de los genotipos 15 y OTI. Los extractos corresponden a las vainas que se cortaron a 20 y 25 DAA (sin tratamiento de estrés) y a las vainas que se cortaron a 20 DAA y se incubaron por 1 (20+1), 2 (20+2), 3 (20+3) y 5 (20+5) días.

Cuando la actividad de β -amilasa se expresó en función de la cantidad de proteína presente en los extractos, no se observaron cambios muy importantes respecto a lo observado en la relación actividad/peso fresco (Figura 15). A diferencia de lo observado con la actividad de α -amilasa, en donde ambos genotipos se comportaron de manera similar (Figs. 12 y 13), los cambios en la actividad de β -amilasa sí son diferentes entre genotipos, siendo evidentemente mayor en OTI. Es igualmente importante destacar que en este genotipo la actividad de β -amilasa sí se incrementa con la edad de las vainas.

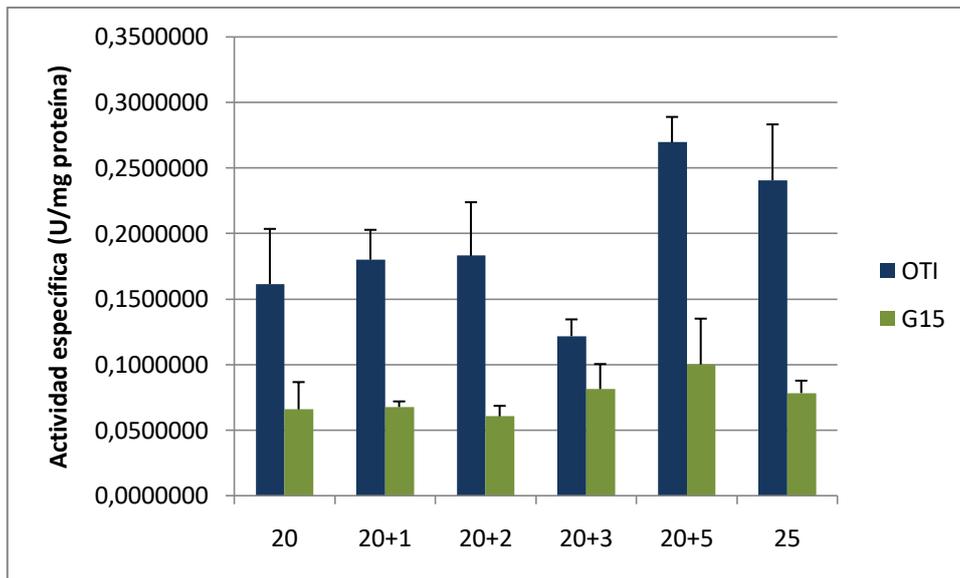


Figura 15. Actividad específica de β -amilasa en muestras de los genotipos 15 y OTI. Los extractos corresponden a las vainas que se cortaron a 20 y 25 DAA (sin tratamiento de estrés) y a las vainas que se cortaron a 20 DAA y se incubaron por 1 (20+1), 2 (20+2), 3 (20+3) y 5 (20+5) días.

5.3 Análisis electroforético de las proteínas presentes en las vainas

Con la finalidad de evaluar si las variaciones en la actividad enzimática eran producto de cambios en la composición de las proteínas presentes, los extractos se analizaron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

En la Figura 16 se pueden observar que los extractos del genotipo OTI se caracterizan por la presencia de 4 bandas muy intensas cuyos pesos moleculares aproximados corresponden a proteínas de 95, 55, 17 y 10 kDa. Es importante destacar el comportamiento de la banda de 17 kDa, cuya intensidad disminuye a medida que transcurren los días después de que fueron cortadas de los frutos. Junto con ello, se incrementa la intensidad de otras bandas más pequeñas. Esto sugiere que la proteína de 17 kDa se degrada en respuesta a la falta de nutrientes y que la aparición de bandas más pequeñas corresponde a productos de su proteólisis.

Dado que es un perfil proteínico completo, las bandas apreciables no se pueden relacionar con ninguna de las amilasas ni con alguna otra proteína en particular.

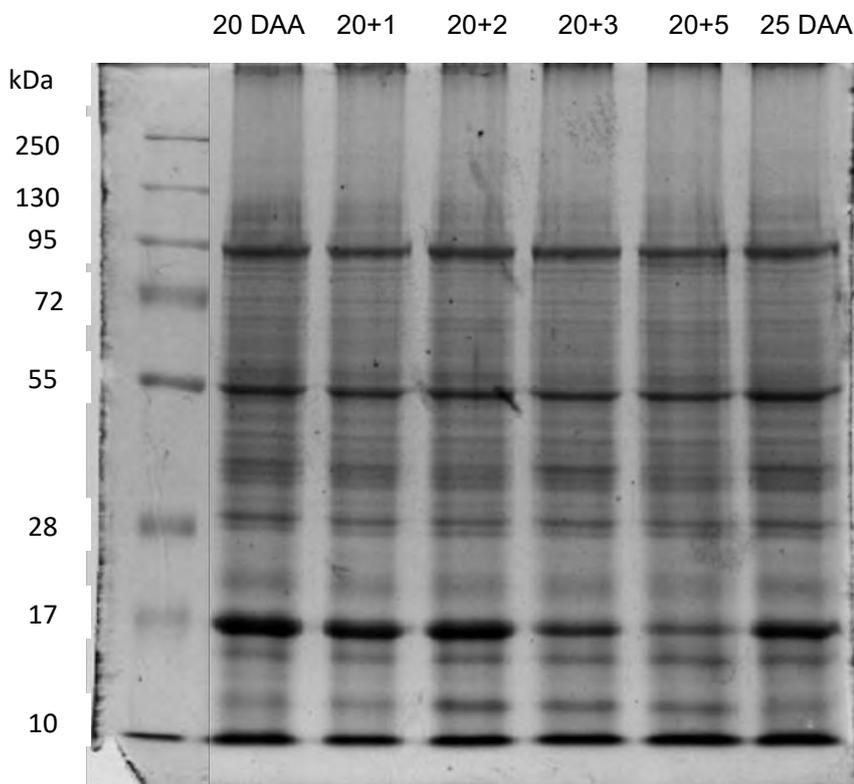


Figura 16. Perfil proteínico de muestras de vainas del genotipo OTI analizadas en condiciones desnaturalizantes. Los extractos corresponden a las vainas que se cortaron a 20 y 25 DAA (sin tratamiento de estrés) y a las vainas que se cortaron a 20 DAA y se incubaron por 1 (20+1), 2 (20+2), 3 (20+3) y 5 (20+5) días.

Por su parte en la Figura 17 puede observarse el perfil proteínico de las muestras del genotipo 15. Los cambios más notables son la presencia de una banda de 46 kDa que no aparece en el genotipo OTI y que la banda de 17 kDa es menos intensa.

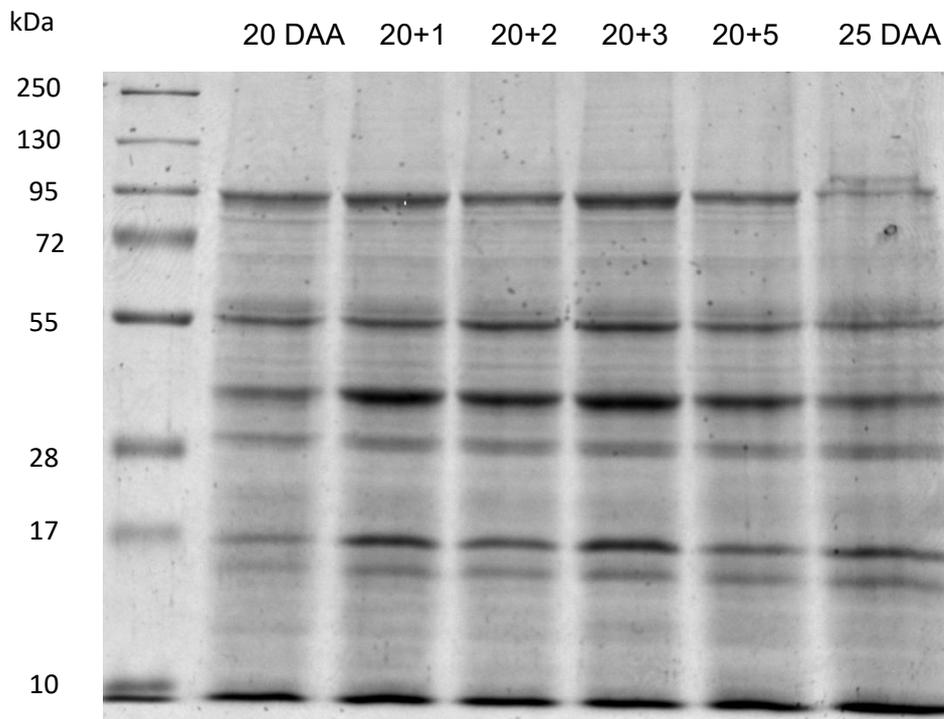


Figura 17. Perfil proteínico de muestras de vainas del genotipo G15 analizadas en condiciones desnaturalizantes. Los extractos corresponden a las vainas que se cortaron a 20 y 25 DAA (sin tratamiento de estrés) y a las vainas que se cortaron a 20 DAA y se incubaron por 1 (20+1), 2 (20+2), 3 (20+3) y 5 (20+5) días.

En este caso, la intensidad de las bandas que se aprecian con mayor facilidad, cambia poco como consecuencia de las condiciones experimentales probadas. La banda de 94 kDa es una excepción a esta regla: casi desaparece a los 25 DAA, pero se mantiene en los extractos de las vainas que fueron separadas de la planta.

Zhong *et al.*, (1997) han reportado que durante el desarrollo del fruto de frijol, antes de la fase de crecimiento acelerado de las semillas, las vainas acumulan proteínas, algunas de las cuales podrían funcionar como proteínas de reserva en el momento en que se presenten condiciones adversas que limiten el desarrollo de las semillas. Esa podría ser la función de la banda de 17 kDa que se aprecia en el genotipo OTI.

Por su parte la banda de 46 kDa se muestra con mayor intensidad en las muestras que fueron sometidas a estrés que en las que no lo fueron; lo cual sugiere que bajo estrés ésta es sintetizada, o bien, activada. Podría incluso

tratarse de alguna enzima, que según el peso observado y lo reportado en la literatura, coincide para una α -amilasa.

5.4 Detección por Western-Blot de α - y β -amilasas

Los geles desnaturalizantes fueron usados para evaluar por western-blot la presencia de α - y β -amilasas. En las Figuras 18 y 19 se presentan los resultados correspondientes a la detección de α -amilasa y β -amilasa en extractos de vainas del genotipo OTI.

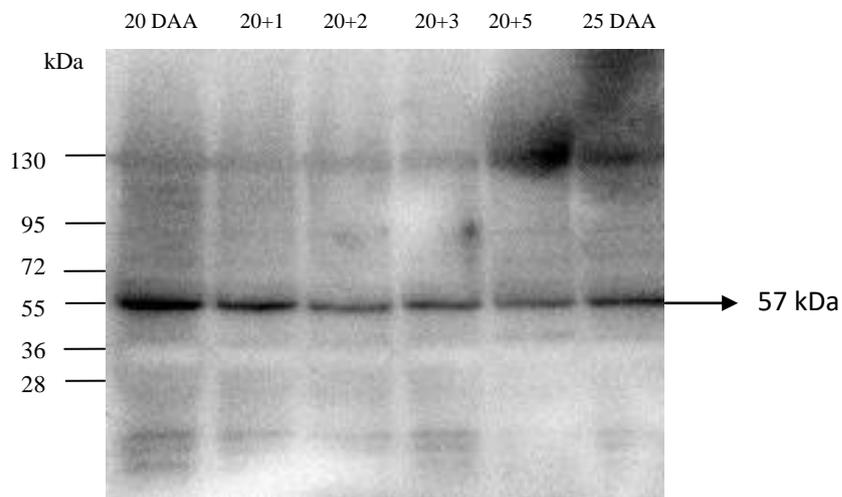


Figura 18. Inmunodetección de α -amilasa en extractos de vainas del genotipo OTI. Los extractos corresponden a las vainas que se cortaron a 20 y 25 DAA (sin tratamiento de estrés) y a las vainas que se cortaron a 20 DAA y se incubaron por 1 (20+1), 2 (20+2), 3 (20+3) y 5 (20+5) días. En cada pozo se cargó el mismo volumen de extracto.

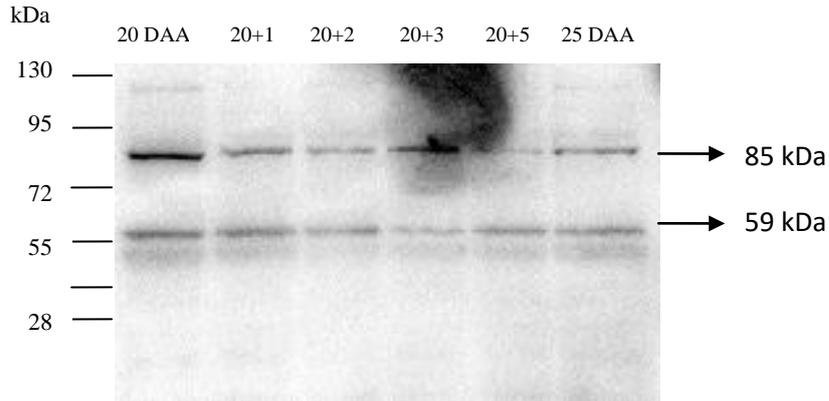


Figura 19. Inmunodetección de β -amilasa en extractos de vainas del genotipo OTI. Los extractos corresponden a las vainas que se cortaron a 20 y 25 DAA (sin tratamiento de estrés) y a las vainas que se cortaron a 20 DAA y se incubaron por 1 (20+1), 2 (20+2), 3 (20+3) y 5 (20+5) días. En cada pozo se cargó el mismo volumen de extracto.

En la Figura 18 puede observarse que el anticuerpo contra α -amilasa detectó una banda de 57 kDa cuya intensidad parece disminuir conforme se incrementa la edad o los días después de que los frutos fueron cortados de la planta; este comportamiento se asemeja a lo observado en el gel desnaturalizante de este genotipo para la banda hallada en 55 kDa (Figura 16), por lo que puede pensarse que se trata de la misma proteína. En la figura 10 se puede apreciar que sin importar el volumen que se cargó, hay mayor actividad de α -amilasa en la muestra 20+5 que en 20 DAA, lo cual sugiere que los cambios de actividad observados en las diferentes muestras (Figura 15), probablemente se deben a un proceso de activación de la enzima presente.

En la Figura 19 se observa que el anticuerpo para β -amilasa detecta dos bandas con pesos moleculares de 59 y 85 kDa. En este caso, no se apreciaron cambios importantes en su intensidad que pudieran ser atribuidos al estrés sometido, por lo que aquí también, es probable que los cambios en la actividad sean producto de un proceso de activación de la enzima presente.

Las Figuras 20 y 21 muestran los resultados del análisis de las muestras de G15.

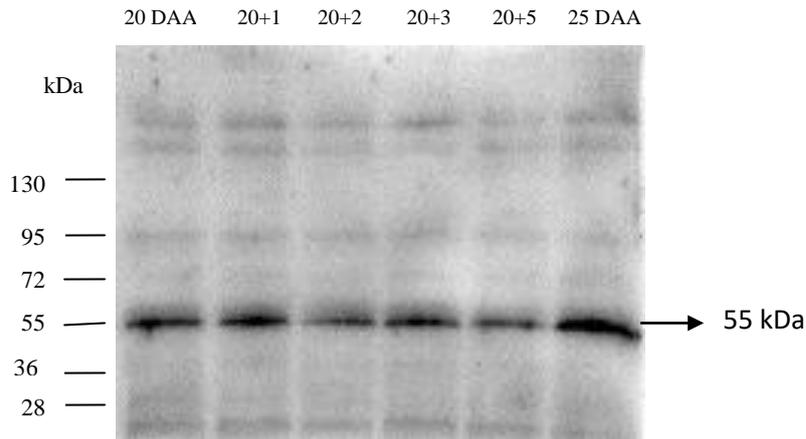


Figura 20. Inmunodetección de α -amilasa en extractos de vainas del genotipo 15. Los extractos corresponden a las vainas que se cortaron a 20 y 25 DAA (sin tratamiento de estrés) y a las vainas que se cortaron a 20 DAA y se incubaron por 1 (20+1), 2 (20+2), 3 (20+3) y 5 (20+5) días. En cada pozo se cargó el mismo volumen de extracto.

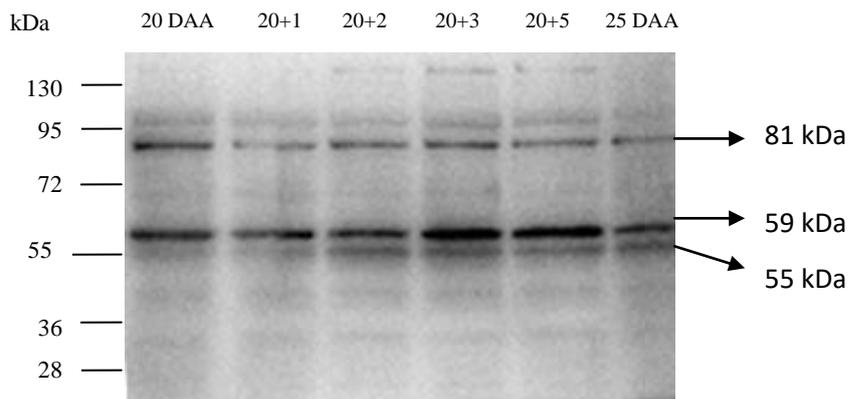


Figura 21. Inmunodetección de β -amilasa en extractos de vainas del genotipo G15. Los extractos corresponden a las vainas que se cortaron a 20 y 25 DAA (sin tratamiento de estrés) y a las vainas que se cortaron a 20 DAA y se incubaron por 1 (20+1), 2 (20+2), 3 (20+3) y 5 (20+5) días. En cada pozo se cargó el mismo volumen de extracto.

En la Figura 20 se aprecia que el anticuerpo para α -amilasa reconoce una banda de 55 kDa, el cual es muy similar al de la banda detectada en los

extractos del genotipo OTI (Figura 18). Su intensidad en este caso, tampoco presenta grandes cambios, salvo el incremento que se observa en la muestra de 25 DAA. En el gel desnaturalizante para este genotipo (Figura 17) se observó una banda con el mismo peso, sin embargo, el comportamiento que presenta en ambos casos es diferente.

Por otro lado, en la Figura 21 se presentan los resultados obtenidos con el anticuerpo específico para β -amilasa. Puede observarse que también se detectan 2 bandas principales (de 59 y 81 kDa), las cuales son de tamaños similares a las observadas en el genotipo OTI (Figura 19). En el caso particular de la banda de 59 kDa, sí parece haber un aumento en la cantidad de proteína en respuesta a la falta de nutrimentos. El anticuerpo también detectó una banda de peso ligeramente menor (55 kDa), la cual puede observarse en todas las muestras aunque en 20 DAA es casi nula, presenta un aumento en la intensidad conforme es mayor el número de días de rezago, lo cual sugiere que está siendo sintetizada como respuesta a este estrés; sin embargo también se encuentra en la muestra 25 DAA, por lo que puede ser resultado del envejecimiento de la vaina. Esta banda coincide mejor con lo observado en la figura 17 para la proteína de este peso.

En la literatura se encontraron pesos reportados para α -amilasa de origen vegetal diferentes a los observados experimentalmente. Por ejemplo, Beers y Stanley (1990) describieron un peso de 43.5 kDa para α -amilasas extraídas de brotes y cotiledones de chícharo. A su vez, Chen *et al.* (1994) describieron un grupo de α -amilasas en arroz con un peso de 44 kDa; además de un segundo grupo de estas enzimas que se expresan cuando la célula percibe una falta de sacarosa, cuyo peso es de 46 kDa. Por otra parte, Fulton *et al.* (2008) informaron los pesos de algunas β -amilasas en muestras de *Arabidopsis thaliana*, los cuales fueron de 54.6, 55.5 y 67.5 kDa; valores que resultan similares a los vistos en el presente trabajo, las bandas reconocidas por el anticuerpo en ambos genotipos.

Existen varios factores que regulan la actividad de las amilasas, como el pH, el estado óxido-reducción, la temperatura, la fuerza iónica, presencia de cofactores, como es el caso del calcio para las α -amilasas; entre otros. Es

probable que algunos de esos pudieran ser parte de la explicación de por qué no hay una buena correlación entre la actividad detectada en los geles nativos y la cantidad de enzima evaluada por western-blot.

Se hace evidente que al someter a estrés a las vainas se genera un cambio en el perfil de diferentes proteínas, las cuales no necesariamente se tratan de enzimas. Algunas de ellas, como la que posee un peso molecular de 17 kDa en las muestras de OTI (Figura 17), se degradan por lo que parecen tener como finalidad proveer de metabolitos a la célula para poder sobrevivir al estrés. Por otro lado, hay proteínas que se generan en mayor cantidad conforme es más prolongado el estrés, tal es el caso de la banda de 46 kDa en el perfil para G15 (Figura 17), la cual, diferente a lo pensado anteriormente, no coincide con los pesos observados experimentalmente para α -amilasas (Figuras 18 y 20).

5.5 Bioinformática

Se ha descrito que la α -amilasa tiene cuatro regiones características e indispensables para su función (Figura 22), cuyas secuencias de aminoácidos se han conservado entre las diferentes especies. (Nakajima *et al.*, 1986).

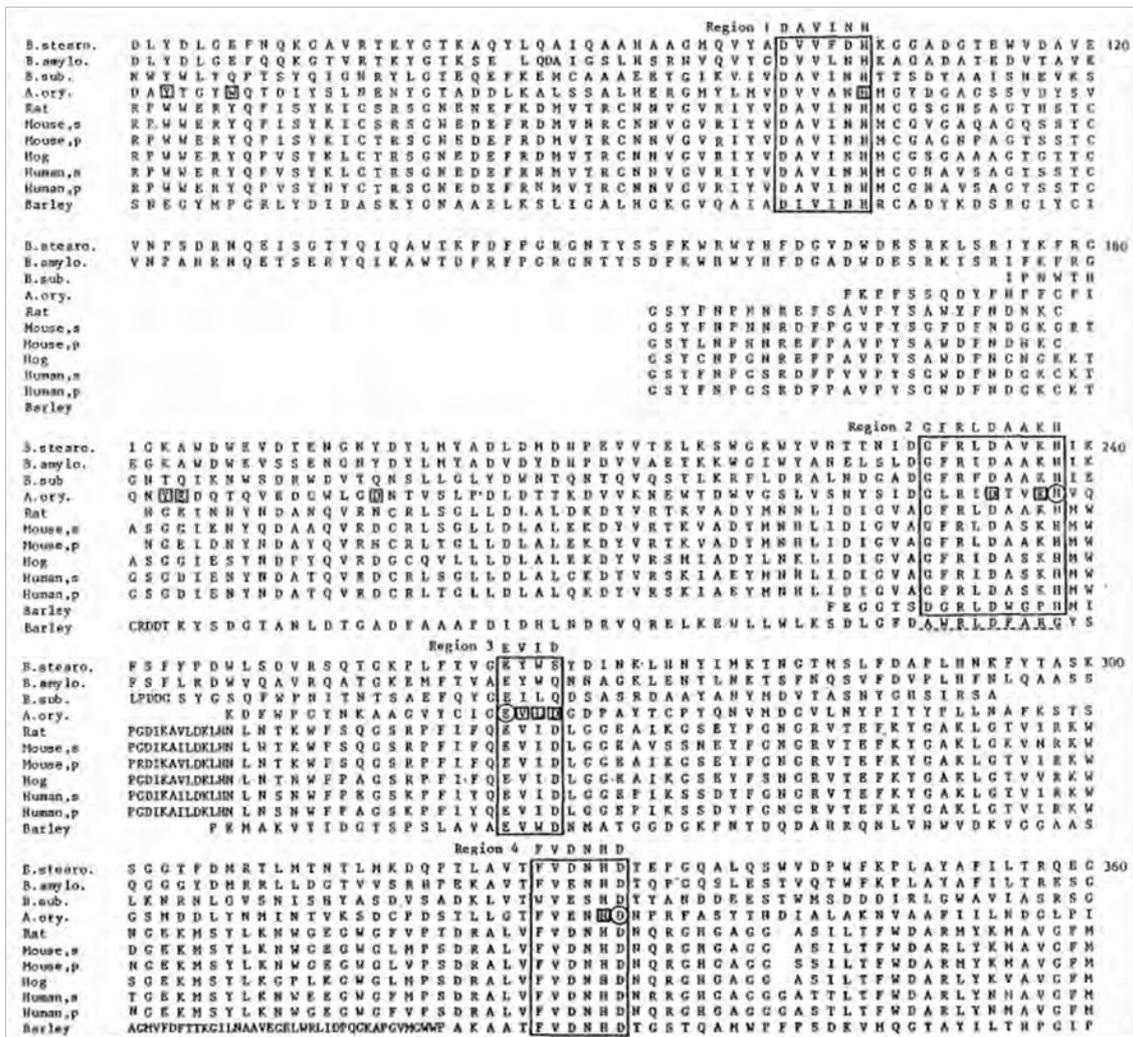


Figura 22. Comparación de secuencias de aminoácidos de α -amilasas de diferentes orígenes. Las regiones conservadas (1, 2, 3 y 4) han sido encerradas en rectángulos (Nakajima *et al.*, 1986).

Por su parte, para β -amilasa se ha informado que su unión al sustrato está acompañada por los movimientos de un bucle interno y un bucle externo (Figura 23), y la catálisis está mediada por un par de residuos de ácido glutámico (Glu) conservados (Fulton *et al.*, 2008).

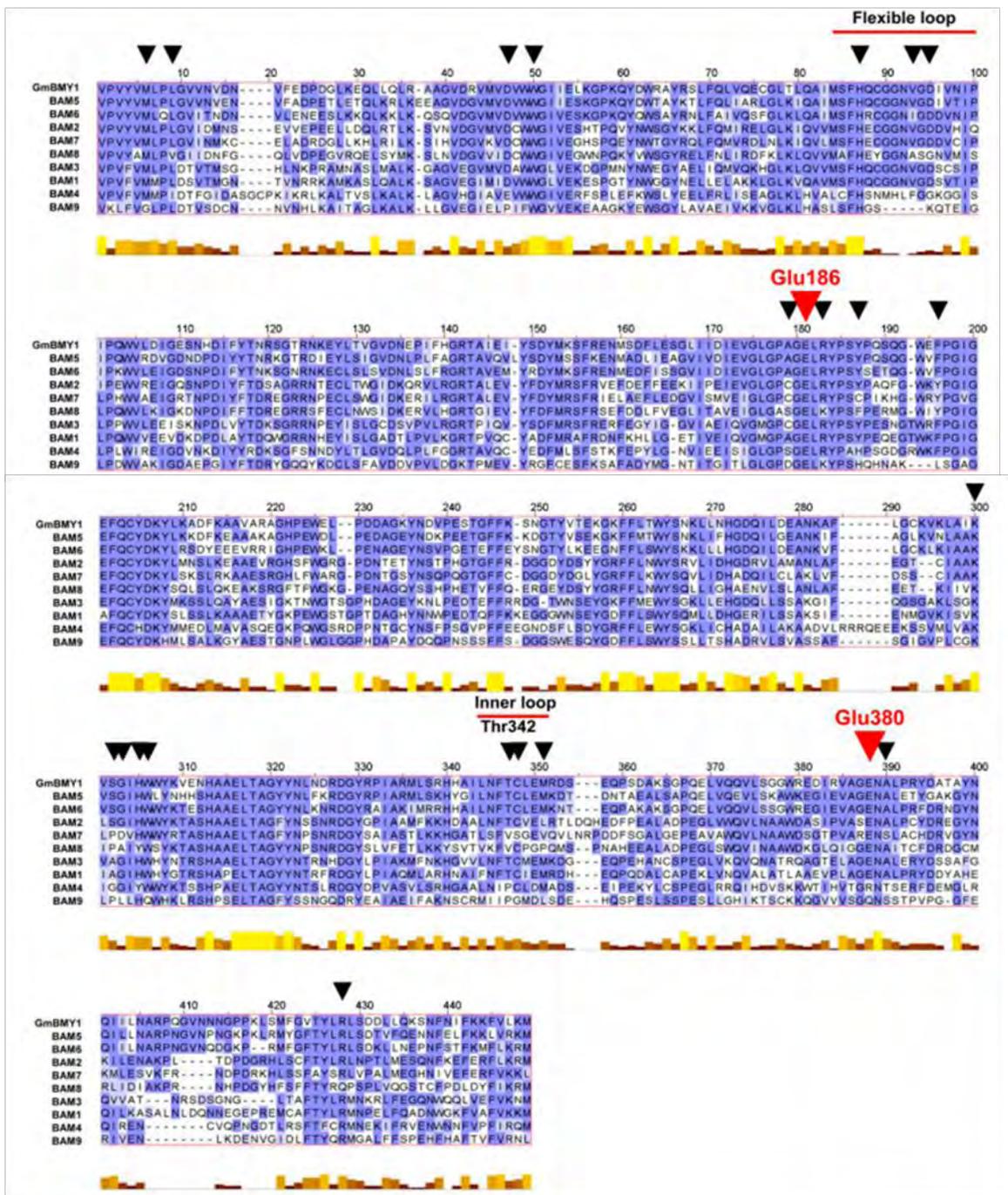


Figura 23. Alineamiento de β -amilasas provenientes de *Arabidopsis* y soya. Los sitios catalíticos son señalados con triángulos rojos. Imagen tomada de Fulton *et al.*, 2008.

Una búsqueda en la base de datos Phytozome reveló que en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* v2.1) existen tres secuencias de α -amilasas y ocho de β -amilasas (Tabla 2).

Tabla 2. Generalidades de las amilasas descritas en Phytozome encontradas en diferentes regiones de la planta de frijol. Los pesos moleculares se calcularon en Bioinformatics.org.

α -amilasas		
Nombre de transcripción	No. aminoácidos	Peso molecular (kDa)
Phvul.010G017600.1	420	46.86
Phvul.008G033800.1	963	109.06
Phvul.001G001900.1	410	46.87
β -amilasas		
Phvul.011G107700.1	497	55.98
Phvul.002G301200.1	549	62.39
Phvul.004G143600.1	568	62.90
Phvul.002G123700.1	657	74.59
Phvul.006G161200.1	532	58.35
Phvul.003G226900.1	548	61.52
Phvul.005G112400.2	599	68.95
Phvul.008G065600.1	700	78.30

Posteriormente, se realizó una comparación entre las secuencias de aminoácidos detalladas por Phytozome y las secuencias reportadas en la literatura para α -amilasas (Figura 24) y β -amilasas (Figura 25); destacando en cada caso las coincidencias en regiones marcadas como importantes para el funcionamiento y/o acoplamiento de tales enzimas.

>Phvul.010G017600.1
MHSFSRSLIFCLFISLSPLFSSALLFQGFNWESSKKGWYNSLKNVDPDIANAGITHVWLPPPSQSVSPEGYLPGRLYDLASRYG
SKDELKSLIAAFHEKGIKCLADIVINHRTAERKDGRGIYCFEGGTPDARDLW/GPSFICKDDTTYS DGTGNNDSGESYDAAPDIDL
NPQVQRELSEWMNWLKTEVGFDFGWRDFVKGYAPSISKIYMEQTRPDFAVGEKWDPLSYENGPYQDHRGALVNWVES
AGGAITAFDFTTKGILQAAVQGLWRLIDPNKPSGMIGVKPENAVTFIDNHDTGSTQRLWPFPSDKVMQGYAYILTHPGTSPF
YDHFDFWGLKEQIAKLSSIRVRNGINEKSTVEIMAAEGDLYAKIDNKIMVKIGPKMDLGLKIPSNFHVATSGQDYAVWE*

>Phvul.008G033800.1
MGAAMPLPDAAGFLFPRCSLVPRHPLICRITSARLIRKRNFFADQRISKSAHIVFHSNDSDDTLTDVWVDEDDLSDVIGIEDEI
VIAKKALSEAQHREEFEKERDQLLEELARSEAKNQEYINTILHDKEVAIAELEAAKSLFQKKLEDSVEEKFSLESKLVAKQDAVDLA
VQVEKLAEVAFQATSHILEDAQLRISSAETTAEEAAHLIEKQIKDATEGTISSIVEKSSHAIERALVVAEEAGELAKRSVETFIGTSA
FTEVADVQAENIKLQGIISDIESQLMVARNEADKLNLELENTREQLLAFEQRANDAEKALLDFQESSKNRLKQEEEMKSMLDKVK
KDVAERAKAISKAFKADLKNIKATVEAAKEVHVKDYAYLRCEALQRLKASEDTLKTWRQRAEMAESLLKGRQLQDEGDDESIY
VVNGGRIDLLTDVDSQKWLLSDGPRREIPQWMARRINAVSPKFPKPKVDVAEAFTSKFRSLELPTADEVWVSIAREKPKDGDALV
EHVYERETIEKKRKRALERALQRKTVQWQRAPEQTTLEPGTGTGREIVFQGFNWESWRRRWYLELAAKTADLHCGVTAVWLPP
PTQSVAPQGYMPSDLYNLNNSYGSVEELKYCIEEMHSQDLLALGDVVLNHRCAQQQSPNGVWNIFGGKLAWGPEAIVCDDPN
FEGRGNPSSGDIFHAAPNIDHSQDFVRKDIKWLNWLRNDIGFDGWRLDFVRGFSGTYYKEYIEASNPFVFAIGEYWDSLGYEHG
SLCYNQDPHRQRINWINATGGTSSAFDITTKGILHSALHNEYWRLIDPQKPTGVMGWWPSRAVTFLENHDTGSTQGHWPFP
RDKLMQGYAYILTHPGTPAIFYDFYDFGIHDMITELEARRRAGIHCSSIKIFHANNEGYSVQVGDALVLKLGQFDWNPSENQ
LEGSWQKFDKGPDPYQVWLRQ*

>Phvul.001G001900.1
MGFLKEQTNQQTDPAAALLRDGKEILLQGFNWESHKHNWWNTLETKVPEIAKSGFTSVWLPPPTHFSFPEGYTPQNLVSLNSKYG
SERQLRALLQKMKQH KVRAMADIVINHRTGTTKGRGGIYNRF DGIPLGWDERAVTSCTGGMGNRSTGAVDFGFPNIDHTQDF
VRKDIIGWLRWLRHDVGFQDFRDFAKGFSKRVREYIEGAKPLFSVGEYWDTCNYKGSLLDYNQDGHQRQVNVWIDGTGQLST
AFDFTTKGILQEAVERGELWRLRDAQGKPPGVGWWSSRAVTFIDNHDTGSTQGHWPFPKDHIMEGYAYILTHPGIPTVYDFHF
YDWGNSIRDQIVKLIDVRKRHGIQSRSGVRIVEARHDLVSAIIGEKVCMKIGNGSWCPSGREWTLATSGHNYAVWQK*

Figura 24. Secuencias de aminoácidos de las tres α -amilasas encontradas para *Phaseolus vulgaris* en Phytozome. Se marca con rojo aquellas regiones de aminoácidos que coinciden con las reportadas en la literatura como características de α -amilasas (Nakajima *et al.*, 1986).

A

>Phvul.011G107700.1

MVITSDRNM LQNYVPVYVMLPLGWTVDSVFGDPNGLKEQLLKRATEIDGVMVDVWVGIVELKGPQYDWSAYRSLFKLVQ
ECGLKLAQAIMSFHQCGGNVGDVVNIPIKVVLDIGESDPDIFYTNRSGTRNKEYLSVGVDDPEIFHGRTAIEIYSDYMKSFRENMS
DFLESGLIVDIEVGLGPA GELRYPSPQNQGWEPGIGEFQCYDKYLKADYKEAVVSAGHPWELPDDAGQYNDVPESSGFFKSN
GTYYTEKGFLLTWYSNKLNLHGQJLDEANKAFLGSKVKLAIKVSGIHWWYKVENHAAELTAGYYNLNDRDGYRPIARMLSRH
HAILNFTCLEMRDS EQSSDAKSGPAELVQVLSGGWTE DILVAGENALPRYDSTAYNQIILNARPQGVNKNKNGPPKAKMFGVTYL
RLSDDLQQS NYDTFKKFLKMHADQGH CEDPQNYNAGTTP LKPLAPKIPVLEATKPIPPFPWLPETDMKIDG*

>Phvul.002G301200.1

MAILSQSTASFSPSVSTRSDFTLRTRFPCRVTFRRRFTVSSCFNSSKSPGAGGFLSPDNGGDVSYELHHDLSAQRRRSGSPVFTM
PVNSVSVREGGRVLRPKAMMFS LKALATAGVEGVVVEIWWGLVEKNKPRVYDW RGYEELVAMACKGLKVRVLSFHQHGAG
PDDPNWIPLPLWVLD EIQKDV ELAYCDRF GRRNIEYISLGDILPVL CGRSPIQVYADF MRDFRDTFRALLGVITGVQJGMGPGG
ELRYPLSSLEENLAWSGELGEFQCYDKYMLASLNASARNIGMREWGNGGPFGTGSLMHNPEHTDFKNDGGSWDRPYGKFF
LEWYS DMLLLHGERICREAEITFRGTEVHISAKLAAIHWHYV TQSHPELTAGYYNTFN RDGYLPIARMFSKYGFSMCCSCFEMQ
DAIMQKINPDGSP EFLRQLLLAARLCDLSLEGQNFSTNLDDG AFTQVLKMSKFYSNGIEKRPF SFNFVRMDKRLFESRNWDRFT
RFVVRQMSNGNIFRARLYSVGDIRFKAAPVMAEARLLYHLYQYS*

>Phvul.004G143600.1

MALSMTHQJGSMAGAAESSFNNGDSTA AAVVKSPG TSLKCKAMRTDGV DGLSPPMSPCMTTDARAVRADLSAVCKALATE
VEVAEEKEHAEGGKKGEGSGVPVFVMMPLDSVTAGNTVNRKAVNAAMAALKSAGVEGVMMDVWWGLVEREKPGEYNW
GGYVELMEMAKKHGLKVQAVMSFHQCGGNVGD SCTIPLPKVWVEEINNDQDLAYTDQWGRRN YEYVSLGCDTLPVLKGRTP
VQCYADFMSFRD TFKHLLGDTIVEIQVGMGPA GELRYPSPQNQGWEPGIGAFQCFDKYMLGSLKAAAEAGKPEWGSTG
PTDAGHYNNWPEDTPFFRKEGGWNSHYGEFFLTWYSQMLLNHGDRILTSAKSIFDNTGVKISVKIAGIHWYHSRSHAPETA
GYYNTRFDHGYLPIAQMLARHGAIFNFTCIEMRDHEQPQDALCAPEKLVKQVALATQKAQVALAGENALPRFDYAEHQIIRAS
QLDVGDSGDREMC AFTYLRMNPHLFEADNWRKFVAFVKKMKEGKRANKCWEEVEREAEHFVHITQPLVQEA AAVLMH*

>Phvul.002G123700.1

MKSINDDGSTQDLDPQSDHSSDYLAHPNSNPHPHPTRRPRGFAAAAAATTNSVAKGKKEREKEKERTKLRERHRRRAITSRMLA
GLRQYGNFPLPARADMNDVLAALAREAGWVVDADGTTYRQCPPPSHMGSFAAKSVESQLSGSLRNCVSKETIENQTSVLRID
ECLSPASIDSVVAERDSRNEKYTNASPIN TVDCL EADQLMQDIHSGVHENDFTGTYPYVPVYVVKLPAGIINKFCQLIDPEGIREELM
HMKSLNVDGVVVDWVGIVEGWSSQYVWWSGYRELFNIVRKFKLKLQVVM AFHECGNDSSDALISLPQWVLDIGKDNQDIF
FTDREGRRNTECLSWGIDKERVLKGR TGIEVYFDMMR SFRTFDDLF AEGLIYAVEVGLGASGELKYPSFSERMGWRYPGIGEFQ
CYDKYLQHSRLKAAKLRGHSFWARGPDNAGHYNSMPHETGFFCERGDYDNYGRFFLHWYSQTLIDHADNVLSLATLAFETKI
VKVPAVYVWYKTPSHAAELTAGYHNPTNQDGYYPVEVLRKHAVTMKFVCLGFHLSSQEANESLIDPEGLS WQVLNSAWDRG
LMAGGENALLCYDREGYKRLVDTAKPRNDPDRHHSFFVYQQPSLLQANVCLSELDFFVKCMHGEMTDP*

B >Phvul.006G161200.1
MEVSVIGTSQAKLGASDLASREVGLCNLTKFKVLSDRVSGQNNR WKKAGISFTLKALRTEPVREEQKRSGPGTKSKTVDGVRLFV
GLPLDAVS YDCNSINHARAIAAGLKALKLLGVEGVELPIWVGIVEKETMGEYDWSGYLAIEMVQKVGLKLHVSLCFHGSKRPN
PLPKWVSQIGESQPNIFFTDKSGQHYKECLSLAVDNLPVLDGKTPIQVYQSFCESEKSSFSFPMGSTITISIMGLGPDGELRYPSSH
QLPSKTEGAGEFQCYDQNMFLKQHAESGNPLWGLGGPHDAPTYHQSPYSSGFFKDGASWESTYGDFFLSWYSNQLIAHG
DCLLSLASSTFGDSGLTIYGRIPLMHSWYGRSHPELTA GFYNTANKDGYEPAQMF AKNSCKMILPGMDLSDAKQPKENHSS
PQLLLAQI MAACRKHVEKVSQNSSESGVSGGFAQJKNLAGDNVLDLFTYHRMGASFFSPEHFPLTFEVRSLKQPELHSDDL
TEEEGAESTVLSHESSVSMQAA*

>Phvul.003G226900.1
MALTLRSSISFINQKTKIKTSDDVPAILSF AKLKPSFRLRVKNSMQEAHHARDNSFNSEARRNEKWEKVHAPSVAHSQSGSKRV
PVYVMLPLDVTVMGSLNKPRAMNASLMALKSAGVEGMVDAWWGLVEKDGPLKYNWEPYAEVLMVMQMHGLKLVVM
SFHQCGGNVGDTCISLPPVWQEEISKNDLVYTDGRNRNPEYISLGCDSPILRGRTPQLQVYADYMRSFRDRFQDYLGSVIVEI
QVGMGPGCGLRYPSPETNGTWRFPGIGEFQCYDKYMKASLAAAAEAIKKKEWGGGGPHDSGQYNQFPEDTGFFKREGTWN
TEYGRFFLEWYSGKLEHGEKILVSAQGIFHTSGVKLSGKVAGIHWHYRARSAAELTAGYYNTRNNDGYMPIARMLAKHGTVF
NFTCMEMKDR EQPDFANCSPEGLVRQVKMATTARAELAGENALERYDADAYAQLVSTSKSESSNGLAAFTYLRMKNRKFEGD
NWRHLVDFVRSMSEGGRTERLPASDSHGSDLYVGHKSTQEKHTKEAVLV*

>Phvul.005G112400.2
MEKKILCAAQRNMATRMITIQFQERYNFQHERMSGEAIRVKRARKQRAMCGFKMDGDHVKKQPRVLPLNASAPKSKVEIHTI
SEDPMLANYVPVYVMLPLGVVTNENVLKDTVR LQNLQMLSHAAGVDGVMVDVWWWGIVESKGPMDYDWSAYRTLQQLVQN
CKLKLQVIMSFHQCGGNVGDVSISLPKWWLVKVGKTNPDIFYTNYKIRNTECLSLGVDKQPLFHGRSPIELYTDYMRSFRDNMQ
DFLESQLIIDIEVGLGPAGELRYPYSQNLG WVFPGIGEFQCYDNYLKADFKKAAAKEGHPWKLDPNAGKSNDKPESTEFKPGG
TYQTEKGNFFLTWYSNKLTHGDDILDEANNVFLGCKVKLAAKVAGIHWYKTESHAAELTAGYYNLHHRDGYRPIARMLSRHN
AILNFTCLEMRNYEQPVEAQS GAEELVRQVLSGKWKENLKVAGENALARYDREAYDQILQNRPNGISKLRPRLKMYGVTVLR
LSDDLMKQKNFEIFTAFVRKMHVNLDHCPDPERYHFTEPMKRSEPRIPLETLEVVTTPLQPYAFLKETDVIQRVLTGFYYIVITVL
RILRIKVKTKG*

>Phvul.008G065600.1
MATDMQRLVGTSEDDEEMGMVDKDEDEEDDYEENGGEQGNASGMVGDGGNEMGTATGDNRFQHQHFHEQVGTGPG
GGTRRSRPVEEKERTKLERERRRAITARILAGLRRHGNYNLRVRADINDVIAALAREAGWVWLPDGTTFPSRSQGGKPAAGNSTV
TSSSSHVASQQTSPSLRGVAGHRSPLEYSASKGVFMPTSPYNLSSTRSQTSIVGDGEAQRDNRP LIGGSMDNADEKQIADLP
PRLPERDLAGSPYVVPVYVMLPLGVINIKCELVDPDGLLKQLRVLKSVHVDGVMVDCWVGIVEAHAPQEYTWNGYKRLFQMV
EVKLLQVVMVMSFHECGGNFGDDVCIPLHWVAEIGRSNPDIFFTDREGRHNPECLSWGIDKERVLRGRTAVEVYDFMRSFRVE
FDEYFEDGLISMVEVGLGPCGELRYPSPVKGWRYPGIGEFQCYDQYMLKSLRKA AEARGHAIWARGPDNAGTYNSQPHEG
FFCDGGDYDGFYGRFFLSWYSQVLVDHG NRVLSLAKLAFEGSCVTAKLSGIYWWYKTASHAAELTAGYYNPNCRDGYAAITML
KINGVSLNIPVELHTUNQHEGFETADPEGLVWQVNLNAGWDVLPVTSQNGFPCLN RVSYNKVLDHAKPMNDPDRHFSS
TYLRLSPVLMERQNFIEFERFVKRMHGEAVLDLQV*

Figura 25. (A) y (B). Secuencias de aminoácidos de las ocho β -amilasas encontradas para *Phaseolus vulgaris* en Phytozome. Se marca con rojo aquellas regiones de aminoácidos que coinciden con las reportadas en la literatura, con azul a las que corresponden al bucle externo, con amarillo a las que corresponden al bucle interno y con verde a las que contienen los residuos catalíticos.

Por otro lado, al comparar el peso molecular de las secuencias encontradas en la base de datos Phytozome (Tabla 2), con los pesos moleculares de las bandas reconocidas en los inmunoensayos se observa que algunas coinciden bastante bien. Tal es caso β -amilasa codificada por el gen Phvul.006G161200.1, cuyo peso molecular es estimado en 58.35 kDa y la β -amilasa detectada en ambos genotipos (OTI y 15) con peso aproximado de 59 kDa. Cabe mencionar que esta enzima no posee regiones similares a las reportadas por Fulton *et al* (2008).

6. Conclusiones

La actividad amilolítica de los extractos de las vainas se incrementó cuando éstas se sometieron a estrés nutricional. Esto sugiere que el control al que está sujeto este sistema enzimático es regulado por el aprovechamiento del almidón almacenado cuando las condiciones ambientales son adversas.

Los resultados del análisis por western-blot indican que la actividad de las amilasas no se correlaciona con cambios en la cantidad de proteína de la enzima; por lo que es probable que el incremento en dicha actividad, sea producto de un proceso de activación.

El uso de ensayos específicos permitió observar que la actividad de β -amilasa se incrementa en respuesta a la deficiencia de nutrimentos que sufren las vainas, mientras que los cambios en la actividad de α -amilasa fueron menos evidentes.

Al comparar los 2 genotipos analizados, se observa que si la actividad se analiza en geles, es mayor para G15 sobre la de OTI, mientras que en los ensayos cuantitativos (en solución) muestran que la actividad de OTI es superior a la de G15.

7. Perspectivas

El presente trabajo revela diferencias muy importantes en las características de la enzimas que en dos genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris*), participan en la degradación del almidón que se acumula en la vaina que protege a las semillas. Así mismo, pone de manifiesto que ese almidón puede contribuir a la formación de las semillas en ambientes que produzcan estrés nutricional. En una etapa posterior podrían realizarse estudios complementarios como:

- Evaluar si los genotipos de frijol difieren en la capacidad con que acumulan almidón en las vainas y en la eficiencia con que lo degradan en condiciones de estrés.
- Extracción, purificación y caracterización de las amilasas provenientes de la vaina
- Identificación de los genes que codifican para enzimas que participan en la degradación del almidón que se acumula en las vainas de los frutos de *Phaseolus vulgaris*
- Análisis sobre la composición de la vaina para evaluar si además del almidón hay otros compuestos que puedan funcionar como materiales de reserva.

Los resultados permitirán analizar si a partir de la acumulación de almidón en la vaina de los frutos (o en otros órganos) es posible mejorar la capacidad de las plantas de frijol para soportar condiciones estresantes.

8. Referencias Bibliográficas

- Andriotis, V., Pike, M., Schwarz, S., Rawsthorne, S., Wang, T., Smith, A., 2012. Altered Starch in Turnover in the Maternal Plant Has Major Effects on Arabidopsis Fruit Growth and Seed Composition. *Plant Physiology*, 160(3), 1175-1186.
- Baldemar, G. (2002). *Estudio de amilasas producidas por bacterias lácticas amilolíticas aisladas del pozol*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
- Beers, E., Stanley, D., 1990. Characterization of α -Amylase from Shoots and Cotyledons of pea (*Pisum stivum* L.) Seedlings. *Plant Physiology*, 92, 1154-1163.
- Bennett, E., Roberts, J., Wagstaff, C., 2011. The role of the pod in seed development: strategies for manipulating yield. *New Phytologist*, 190, 838-853.
- Bernal, L., Martínez, E., 2006. Una nueva visión de la degradación del almidón. *Revista del Centro de Investigación*, 7(25), 77-90.
- Bernal, L. (2009). *Factores involucrados en la degradación de almidón en hojas de plantas de frijol sometidas a estrés por deficiencia de fosfato*. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
- Blennow, A., Engelsens, S., Nielsen, T., Baunsgaard, L., Mikkelsen, R., 2002. Starch phosphorylation: a new front line in starch research. *TRENDS in Plant Science*, 7, 445-450.
- Broughton, W., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., Vanderleyden, J., 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant Soil*, 252, 55-128.
- Chen, M., Liu, L., Chen, Y., Wu, H., Yu, S., 1994. Expression of α -amylases, carbohydrate metabolism, and autophagy in cultured rice cells is coordinately regulated by sugar nutrient. *The Plant Journal*, 6(5), 625-636.

- Cuellar, S., Arrieta, M., Acosta, J., Covarrubias, A., 2008. Relationship between carbohydrate partitioning and drought resistance in common bean. *Plant, Cell and Environment*, 31, 1399-1409.
- Debouck, D., Hidalgo, R., 1985. Morfología de la planta de frijol común. **En:** M. López, F. Fernández y A. van Schoonhoven. eds. *Frijol: Investigación y Producción*. Cali: CIAT, 7-47.
- Doyle, E., Lane, A., Sides, J., Mudgett, M., Monroe, J., 2007. An α -amylase (At4g25000) in *Arabidopsis* leaves is secreted and induced by biotic and abiotic stress. *Plant, Cell and Environment*, 30, 388-398.
- EMBL-EBI, 2018. *Clustal Omega, Multiple Sequence Alignment*. [En línea] (Actualizado al 2018).
Disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> [Último acceso el 18 de Enero de 2018].
- Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA). 2016. Panorama Agroalimentario Frijol 2016.
- Fulton, D., Stettler, M., Mettker, T., Vaughan, C., Li, J., Francisco, P., Gil, M., Reinhold, H., Eicke, S., Messerli, G., Dorken, G., Halliday, K., Smith, A., Smith, S., Zeeman, S., 2008. β -AMYLASE4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active β -amylases in *Arabidopsis* chloroplasts. *The Plant Cell*, 20, 1040-1058.
- Graham, P., Rosas, J., Estevez de Jensen, C., Peralta, E., Tlustý, B., Acosta, G., Arraes, P., 2003. Addressing edaphic constraints to bean production: the bean/cowpea CRSP Project in perspective. *Field Crop Res*, 82, 179-192.
- Hernández, G., Ramírez, M., Valdés, O., Tesfaye, M., Graham, M., Czechowski, T., Schlereth, A., Wandrey, M., Erban, A., Cheung, F., Wu, H., Lara, M., Town, C., Kopka, J., Udvardi, M., Vance, C., 2007. Phosphorous stress in common bean: root transcript and metabolic responses. *Plant Physiology*, 44, 753-767.
- Herrera, T., Ortiz, J., Delgado, A., Acosta, J., 2012. Crecimiento y contenido de prolina y carbohidratos de plántulas de frijol sometidas a estrés por sequía. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(4), 713-725.

- Lara, M., 2015. El cultivo del frijol en México. *Revista Digital Universitaria*, 16(2), 2-11.
- Le, B., Wagmaister, J., Kawashima, T., Bui, A., Harada, J., Goldberg, R., 2007. Using Genomics to Study Legume Seed Development. *Plant Physiology*, 144, 562-574.
- Mahmood, T., Yang, P., 2012. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429-434.
- Matilla, A. 2008. Desarrollo y germinación de las semillas. **En:** J. Azcón y M. Talón. eds. *Fundamentos de fisiología vegetal*. España: McGraw Hill, 537-558.
- Miranda, S., 1967. Origen de *Phaseolus vulgaris* L. (Frijol Común). *Agrociencia*, 1(2), 99-109.
- Nakajima, R., Imanaka, T., Aiba, S., 1986. Comparison of amino acid sequences of eleven different α -amylases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 23, 355-360.
- Nakano, H., Muramatsu, S., Makino, A., Mae, T., 2000. Relationship between the suppression of photosynthesis and starch accumulation in the pod-removed bean. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27, 167-173.
- Oliker, M., Mayer, M., Poljakoff-Mayber, A., 1978. The Availability of Transpirationally Supplied Sucrose for Metabolic Processes in the Pod and Seeds of *Phaseolus vulgaris*. *American Journal of Botany*, 65(3), 372-374.
- Pessaraki, M., 2001. Induction of proteins in response to biotic and abiotic stresses. **En:** Timothy, S., Pessaraki, M. eds. *Handbook of Plant and crop physiology*. Florida. Taylor and Francis Group, 657-680.
- Quminet.com, 2000-2017. *Todo sobre el frijol*. [En línea] (Actualizado al 31 de Octubre de 2007).

Disponible en: <https://www.quiminet.com/articulos/todo-sobre-el-frijol-23249.htm> [Último acceso el 18 de Septiembre de 2017].

- Reyna, R., Robles, R., Reyes, R., Mendoza, Y., Romero, J., 2004. Hidrólisis enzimática del almidón. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 7(1), 40-44.
- Schuler, M., Zielinski, R., 1989. *Methods in Plant Molecular Biology*. Illinois: Academic Press, Inc.
- Scilico, 2018. *Bioinformatics.org*. [En línea]
Disponible en: <http://www.bioinformatics.org/> [Último acceso el 12 de Febrero de 2018].
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2017. *Aumenta 14 por ciento producción de frijol en México*. [En línea].
Disponible en: <https://www.gob.mx/sagarpa/prensa/aumenta-14-por-ciento-produccion-de-frijol-en-mexico> [Último acceso el 26 de Febrero de 2018].
- Seung, D., Thalmann, M., Sparla, F., Abou, M., Kyu, S., Issakidis-Bourguet, E., Svensson, B., Zeeman, S., Santelia, D., 2013. *Arabidopsis thaliana* AMY3 Is a Unique Redox-regulated Chloroplastic α -Amylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(47), 33620-33633.
- Stanley, D., Rejzek, M., Naested, H., Smedley, M., Otero, S., Fahy, B., Thorpe, F., Nash, R., Harwood, W., Svensson, B., Denyer, K., Field, R., Smith, A., 2011. The Role of α -Glucosidase in Germinating Barley Grains. *Plant Physiology*, 155, 932-943.
- Stitt, M., Gibon, Y., Lunn, J., Piques, M., 2007. Multilevel genomics analysis of carbon signalling during low carbon availability: coordinating the supply and utilisation of carbon in a fluctuating environment. *Functional Plant Biology*, 34(6), 526-549.
- Stitt, M., Lunn, J., Usadel, B., 2010. *Arabidopsis* and primary photosynthetic metabolism – more than the icing on the cake. *The Plant Journal*, 61, 1067-1091.
- Stitt, M., Zeeman, S., 2012. Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(3), 282-292.

- Stolle, T., Beekhuizen, J., Kok, M., Pijnenbur, M., Recourt, K., Derksen, J., Voragen, A., 1999. Changes in Cell Wall Polysaccharides of Green Bean Pods during Development. *Plant Physiology*, 121, 363-372.
- Streb, S., Zeeman, S., 2012. Starch Metabolism in Arabidopsis. *The American Society of Plant Biologists*, 15, 2-26.
- U.S. Department of energy, 1997-2007. *Phytozome 12. The plant genomics resource*. [En línea] (Actualizado al 2017).
 Disponible en: <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html> [Último acceso el 8 de Septiembre de 2017].
- Zeeman, S., Smith, S., Smith, A., 2007. The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochemical Journal*, 401, 13-28.
- Zhong, P., Tanaka, T., Yamauchi, D., Minamikawa, T., 1997. A 28-Kilodalton Pod Storage Protein of French Bean Plants. *Plant Physiology*, 113, 479-485.