



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TÍTULO DEL TEMA ESCRITO

***ESTUDIO DEL PAPEL DE LA VAINA EN EL DESARROLLO DE SEMILLAS
DE FRIJOL.***

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

RODRÍGUEZ REYES RICARDO JONATHAN



CIUDAD DE MÉXICO

2019



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: Profesor: **Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre**
VOCAL: Profesor: **Dr. J. Eleazar Martínez Barajas**
SECRETARIO: Profesor: **Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig**
1er. SUPLENTE: Profesor: **Dra. Francisca Morayna Gutiérrez Luna**
2° SUPLENTE: Profesor: **Dra. María Del Consuelo Plata Ramos**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 102; CONJUNTO “E” DEL DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA: Dr. Eleazar Martínez Barajas

(Nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):

(Nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): Ricardo Jonathan Rodríguez Reyes

(Nombre (s) y firma (s))

ÍNDICE

Índice de figuras.

Abreviaturas.

1	Resumen	1
2	Introducción	2
	2.1) Panorama general del frijol	2
	2.2) Importancia del frijol en México	3
	2.3) Importancia de la vaina en el desarrollo de la semilla	3
	2.6) Desarrollo de la planta de frijol	5
	2.7) Almidón	7
	2.5) Amilasas	10
3	Hipótesis	12
4	Objetivos	12
	a) Objetivo general	12
	b) Objetivos particulares	12
	A) Instrumentación	13
	B) Método	13
	B.1) Material biológico	13
	B.2) Cuantificación de proteína en las semillas	15
	B.3) Cuantificación de almidón	15
	B.4) Cuantificación de azúcares solubles	17
	B.5) Medición de actividad de amilasas	17
	B.6) Identificación de amilasas	18
5	Resultados	21
	5.1) Efecto del desarrollo sobre la cantidad de almidón y azúcares solubles en las vainas de los frutos de los genotipos G15 y OTI	21

5.2) Actividad de amilasas en las vainas de los genotipos G15 y OTI durante el desarrollo de los frutos	25
5.3) Análisis de los cambios en la abundancia de α y β -amilasa en vainas durante el desarrollo de los frutos	26
5.4) Efecto de la restricción de nutrientes sobre las cantidades de proteína y almidón presentes en la semilla	28
5.5) Análisis de las cantidades de almidón y azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) presentes en las vainas de 12 genotipos de frijol	33
6 Discusión	38
7 Conclusiones	41
8 Perspectivas.....	42
9 Referencias bibliográficas	43

Índice de figuras.

Figura 1. Partes que conforman la vaina de frijol.....	4
Figura 2. Desarrollo de la planta de frijol. Etapas de la fase vegetativa.	6
Figura 3. Desarrollo de la planta de frijol. Etapas de la fase reproductiva.....	7
Figura 4. Estructura química de amilosa y amilopectina	8
Figura 5. Mecanismo de síntesis de carbohidratos durante la fotosíntesis y en su ausencia. Modificado de Rolland <i>et al.</i> , 2006.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 6. Transporte de sacarosa de los tejidos fotosintéticos a tejidos no fotosintéticos. Modificado de Curtis y Barnes, 1997.	10
Figura 7. Hidrólisis enzimática de almidón. Modificado de Uhlig H., 1998.	10
Figura 8. Comportamiento de la cantidad de almidón en vainas durante el desarrollo de los genotipos de OTI y G15.....	21
Figura 9. Efecto del desarrollo sobre la cantidad de glucosa presente en la vaina durante el desarrollo de los frutos de los genotipos G15 y OTI.	22
Figura 10. Cantidad de fructosa en vainas de los genotipos G15 y OTI a lo largo del desarrollo de los frutos.	23
Figura 11. Cantidad de sacarosa presente en las vainas de los frutos de los genotipos G15 y OTI a lo largo de su desarrollo.	24
Figura 12. Gel nativo para medir actividad de amilasas en vainas de los genotipos G15 y OTI durante el desarrollo de los frutos.	25
Figura 13. Análisis por western de los cambios en la cantidad de β -amilasas (A) durante el desarrollo de los frutos. B, gel desnaturalizante en donde se muestran las proteínas presentes en los extractos.	26
Figura 14. Evaluación por western blot de los cambios en la cantidad de α -amilasa en vainas de los genotipos G15 y OTI durante el desarrollo de los frutos (A). B. gel	

desnaturalizante teñido con azul de Coomasie en donde se aprecian las proteínas presentes en los extractos por 40 días de la planta.	27
Figura 15. Cantidad de proteína en la semilla de 12 genotipos de frijol que se desarrollaron en condiciones normales o en frutos que fueron cortados de la planta 20 DDF.....	29
Figura 16. Reducción de la cantidad de proteína (%) como consecuencia de la falta de nutrientes que experimentaron las semillas de 12 genotipos de frijol como consecuencia de cortar los frutos a 20 DDF.	29
Figura 17. Análisis del efecto de la restricción nutricional severa sobre las características de las proteínas presentes en las semillas de 12 genotipos de frijol.	30
Figura 18. Cantidad de almidón en semillas de 12 genotipos de frijol cuyos frutos fueron cortados a 20 DDF o que se desarrollaron normalmente.	31
Figura 19. Reducción de la cantidad de almidón (%) en semillas de frijol como consecuencia de la restricción nutricional a la que se sometieron durante su desarrollo.	31
Figura 20. Correlación de las reducciones en las cantidades de almidón y proteína en 12 genotipos de frijol que se sometieron a una restricción nutricional severa durante su desarrollo.....	32
Figura 21. Cantidad de almidón presente en las vainas de frutos de 20 DDF en 12 genotipos. de frijol.	33
Figura 22. Cantidad de glucosa en vainas de 12 genotipos de frijol.	34
Figura 23. Cantidad de fructosa en la vaina de 12 genotipos de frijol.	34
Figura 24. Cantidad de sacarosa en vaina de 12 genotipos de frijol.	35
Figura 25. Relación entre la cantidad de azúcares presentes en las vainas de 12 genotipos de frijol a 20 DDF y la disminución en la cantidad de almidón (%) en semillas que lograron desarrollarse en frutos que se cortaron en ese momento. ...	36

Figura 26. Relación entre la cantidad de azúcares totales presentes en vaina de 12 genotipos de frijol a 20 DDF y la disminución de proteína en las semillas que se desarrollan en frutos que se cortan en ese momento.37

Abreviaturas.

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
DDF	Días después de la floración
DTT	Ditiotreitol
PGI	Fosfo-glucosa isomerasa
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
INV	Invertasa
kDa	Kilo Dalton
MeOH	Metanol
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µmol	Micromol
µM	Micromolar
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
TEMED	N, N, N', N'-tetrametietilendiamina
APS	Persulfato de amonio
PF	Peso fresco
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBST	Tris-buffered saline-tween20

1 Resumen

El efecto de la falta de nutrientes que resulta de cortar los frutos en una etapa temprana de su desarrollo (20 días después de la floración) sobre la cantidad de proteína y carbohidratos presentes en semillas, fue evaluado en 12 genotipos de frijol.

Los resultados obtenidos muestran diferencias muy importantes entre genotipos. Sin embargo, consistentemente se observó que la reducción en la cantidad de proteína fue mayor que la de almidón.

Dado que en los frutos que son cortados de la planta, los materiales acumulados en los tejidos de la vaina son usados para el desarrollo de las semillas; los cambios en las concentraciones de azúcares solubles y almidón fueron evaluados durante el desarrollo de los frutos. En este caso, también se encontraron notables diferencias entre genotipos.

Sin embargo, cuando se relacionaron las cantidades de azúcares (solubles y almidón) acumulados en la vaina, con la magnitud del efecto negativo que sobre la semilla tuvo la falta de nutrientes que se produjo cuando los frutos fueron cortados de la planta; se observó que no hay relación directa, y que, en algunos genotipos a pesar de acumular grandes cantidades de azúcares en la vaina, sus semillas también presentaron reducciones muy importantes en las cantidades de proteína y almidón.

2 Introducción

2.1) Panorama general del frijol

El frijol es una planta que pertenece a la familia de las leguminosas; es originaria de América y tiene dos acervos genéticos, el Mesoamericano y el Andino (Hernández *et al.*, 2013). México es considerado como uno de los centros de origen de este cultivo y vestigios encontrados en cuevas de Tamaulipas, Puebla y Oaxaca sugieren que su domesticación ocurrió hace aproximadamente 8,000 años (Hernández *et al.*, 2013). Las semillas de frijol tienen un alto contenido proteico (20-25%) y de carbohidratos (35-40%) lo que sin duda contribuye a que entre las leguminosas sea el tercer cultivo más importante en el mundo (Singh *et al.*, 1999).

Los cultivos de frijol también presentan una ventaja ecológica muy importante, pues la asociación que establecen con bacterias fijadoras de nitrógeno contribuye a la nutrición del cultivo y a mejorar la fertilidad de los suelos (Gálvez *et al.*, 2015).

La diversidad de poblaciones silvestres del frijol es un recurso importante para el mejoramiento genético del cultivo. Se trata de poblaciones que a lo largo de los años han sobrevivido a la exposición reiterada a condiciones adversas, lo que les ha permitido incrementar la frecuencia de alelos que contribuyen a mejorar su tolerancia a diversos factores ambientales (frío, sequía, calor, enfermedades y plagas). Mediante programas de mejoramiento genético, esas características pueden utilizarse para ampliar la base genética de las variedades de frijol que se cultivan en la actualidad (Sotelo *et al.*, 1995). Sin embargo, la creciente integración de los productores al mercado, las importaciones y la migración, así como la competencia entre variedades modernas y tradicionales, el tipo de tenencia de la tierra y el aumento de la población humana son factores que han propiciado el deterioro ambiental y la pérdida de diversidad genética en esta leguminosa (Cárdenas, 2000).

2.2) Importancia del frijol en México

En México el cultivo de frijol tiene gran importancia socioeconómica; junto con el maíz constituyen la base de la alimentación de gran parte de la población. La producción nacional es aproximadamente 1.08 millones de toneladas anuales y representa el 5.5% de producción mundial. Este volumen es suficiente para satisfacer el 90% del consumo nacional. Sin embargo, en el periodo 2003-2016 la superficie sembrada se redujo en 20.01% y la producción disminuyó en 23.05% (SAGARPA, 2017). Siendo el cambio climático una de las principales razones. Por otra parte, para el año 2030 se estima un aumento en el consumo nacional de 1.22 a 1.44 millones de toneladas (SAGARPA, 2017), de ahí la necesidad de desarrollar estrategias que permitan la obtención de variedades de frijol capaces de tener una producción de semillas aceptable bajo condiciones ambientales cada vez más adversas.

2.3) Importancia de la vaina en el desarrollo de la semilla

La vaina es el fruto de las plantas leguminosas; es una estructura conformada por dos valvas, las cuales están unidas por dos suturas llamadas placental y ventral, las cuales se forman a partir de un único carpelo (Fig. 1). Es un órgano fotosintéticamente activo que encierra a las semillas durante su desarrollo y cuyo papel es fundamental para la supervivencia de la especie.

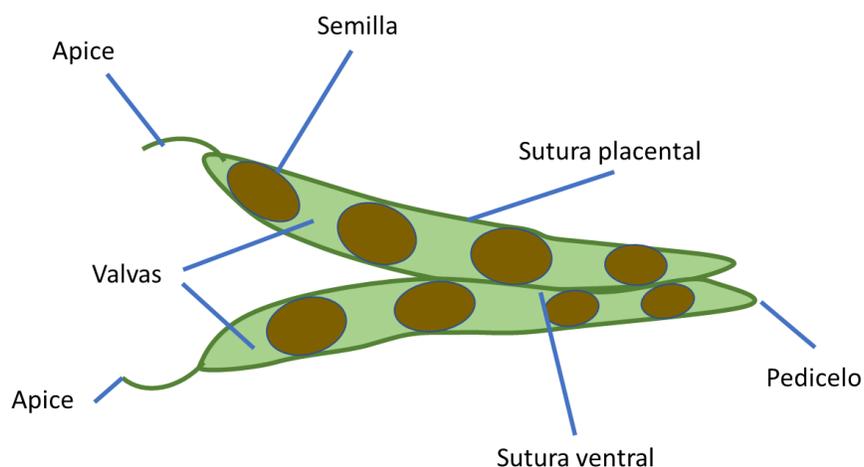


Figura 1. Partes que conforman la vaina de frijol.

Se ha establecido que, la vaina es capaz de almacenar nitrógeno y carbono (Harvey, 1973) en forma de compuestos que en algún momento son usados para la producción de semillas. Esta situación constituye una ventaja, especialmente cuando la planta recibe algún daño o se expone a condiciones adversas que limitan la disponibilidad de fotosintatos (Feller y Fischer, 1994).

Además de proteger a las semillas durante su desarrollo, la vaina permite el paso de luz con longitudes de onda en el rojo lejano, las cuales pueden inducir su latencia. Este fenómeno de latencia que impide la germinación uniforme representa una gran ventaja para especies que habitan en ambientes variables donde las condiciones no son siempre favorables (Borthwick *et al.*, 1951).

Por otra parte, durante las primeras etapas del desarrollo del fruto, las vainas son estructuras fotosintéticamente activas, capaces de producir ATP y NADPH que son usados para la fijación del CO₂ (Fuhrmann *et al.*, 1994).

Se ha observado que daños a las vainas reducen el almacenamiento de proteína en las semillas. Esas mismas condiciones pueden aumentar la expresión de enzimas que al participar en la removilización de recursos, forman parte de una

estrategia mediante la cual, la vaina redistribuye sus nutrientes para apoyar el desarrollo de semillas (Gattolin *et al.*, 2006; Bennett *et al.*, 2011).

2.6) Desarrollo de la planta de frijol

En el desarrollo de la planta de frijol suceden cambios estructurales y fisiológicos cuya progresión se puede ver afectada tanto por el genotipo como por los factores climáticos. Aun así, se pueden distinguir dos fases principales: la vegetativa y la reproductiva.

Fase vegetativa

Esta fase se inicia cuando a la semilla se le dan las condiciones adecuadas para que comience su germinación y finaliza con la aparición de los primeros botones florales. A su vez, se puede dividir en cinco etapas:

- Germinación: emerge la radícula y ésta se convierte en las raíces primarias para posteriormente dar paso a la aparición de raíces secundarias y terciarias.
- Emergencia: los cotiledones de la planta aparecen a nivel del suelo, comienzan a separarse y el epicotilo inicia su desarrollo.
- Hojas primarias: las hojas primarias son unifoliadas, opuestas y orientadas, en esta etapa se despliegan horizontalmente. Los cotiledones se arquean y se arrugan.
- Primeras hojas trifoliadas: la primera hoja trifoliada es desplegada, los cotiledones finalmente caen.

- Tercera hoja trifoliada: En esta etapa, además del despliegue de la tercera hoja trifoliada, dependiendo del genotipo se puede observar la diferenciación entre tallo y ramas, así como la presencia de algunas otras hojas trifoliadas. Es la etapa más larga, con una duración aproximada de 15 días.

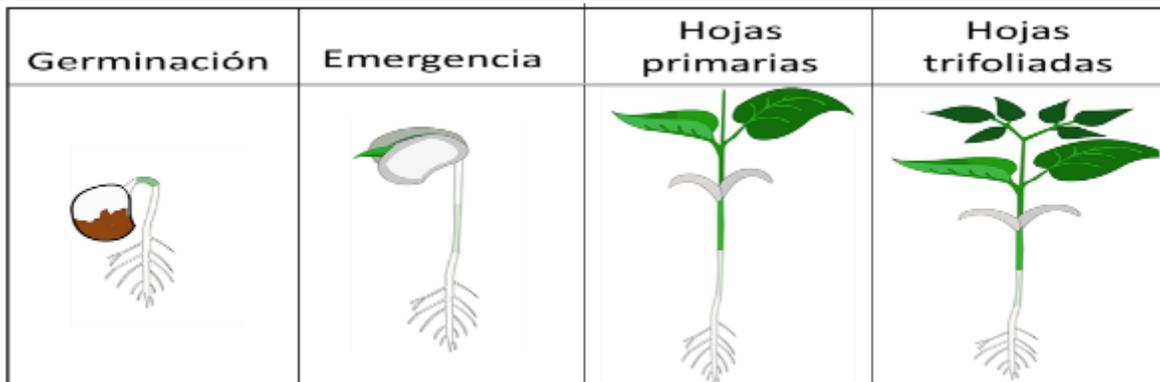


Figura 2. Desarrollo de la planta de frijol. Etapas de la fase vegetativa.

Fase reproductiva

En esta fase comienza el desarrollo de estructuras reproductivas, dando lugar a la floración, así como el desarrollo de las vainas y el llenado de las semillas. Esta fase está dividida en 5 etapas las cuales son:

- Prefloración: comienza el desarrollo de botones florales
- Floración: esta se inicia cuando se presenta la primera flor abierta.
- Formación de vainas: la planta presenta la primera vaina en cuyo extremo pueden estar los residuos de la flor.
- Llenado de vainas: comienza el crecimiento de las semillas, se presentan abultamientos que corresponden a el crecimiento de las semillas.

- Maduración: las plantas inician la decoloración y secado de las vainas. Las hojas se tornan amarillas y caen. Finalmente, todas las partes de la planta se secan.

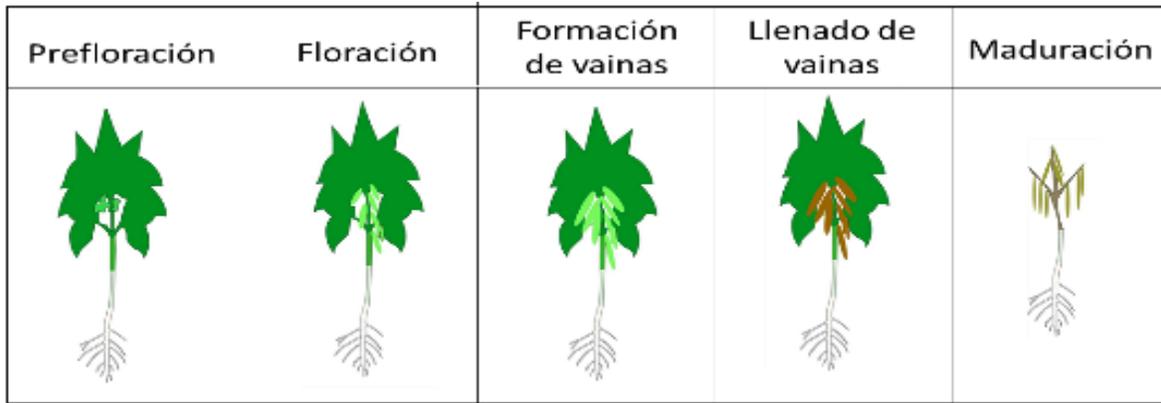


Figura 3. Desarrollo de la planta de frijol. Etapas de la fase reproductiva

2.7) Almidón

El almidón es un polisacárido compuesto por moléculas de glucosa, las cuales se organizan en polímeros de amilosa (Fig. 4A) y amilopectina (Fig. 4B). La amilosa, es una estructura lineal, formada de aproximadamente 6000 unidades de glucosa unidas por enlaces α -1,4 glucosídicos. Por su parte la amilopectina es un polímero que está constituido por cadenas lineales de moléculas de glucosa unidas mediante enlaces α -1,4 a la que mediante enlaces α -1,6 se unen cadenas de glucanos. Esto da como resultado una molécula ramificada (Agama-Acevedo, *et al*, 2013). En los gránulos ambas moléculas se ordenan radialmente de manera que las moléculas de amilosa se disponen entre las de amilopectina. Los humanos somos capaces de digerir estas estructuras gracias a las amilasas y glucosidasas que están presentes en la saliva y en el jugo pancreático.

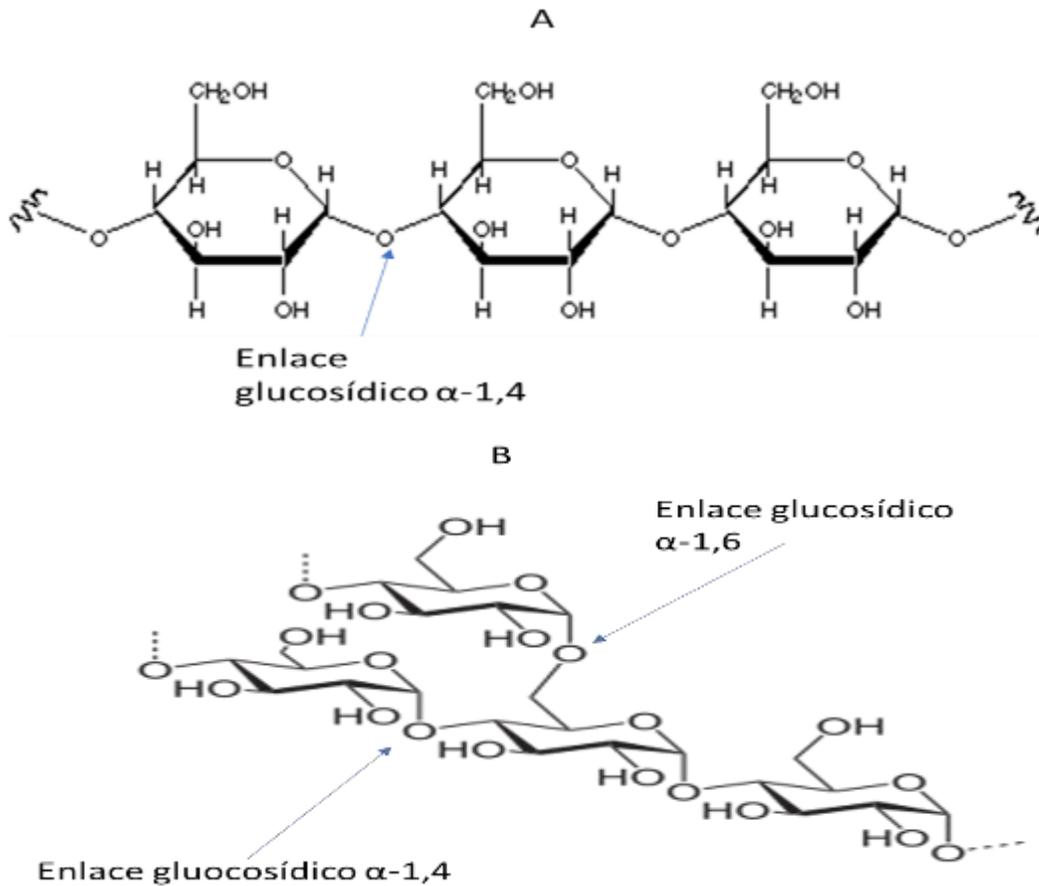


Figura 4. Estructura química de amilosa y amilopectina

Se estima que el almidón aporta el 50% de las calorías que consumen los seres humanos diariamente.

El almidón también es una molécula muy importante en la fisiología de la planta. Se sintetiza en los cloroplastos de las hojas y en los amiloplastos de órganos de reserva (Vajravijayan *et al*, 2018). En los cloroplastos, el carbono que se usa para su síntesis proviene de la fotosíntesis. En este caso, la mayor parte del almidón que se sintetiza durante el día se degrada por la noche (Streb & Zeeman, 2012), para enfrentar la falta de energía durante el periodo de oscuridad (Fig. 5)

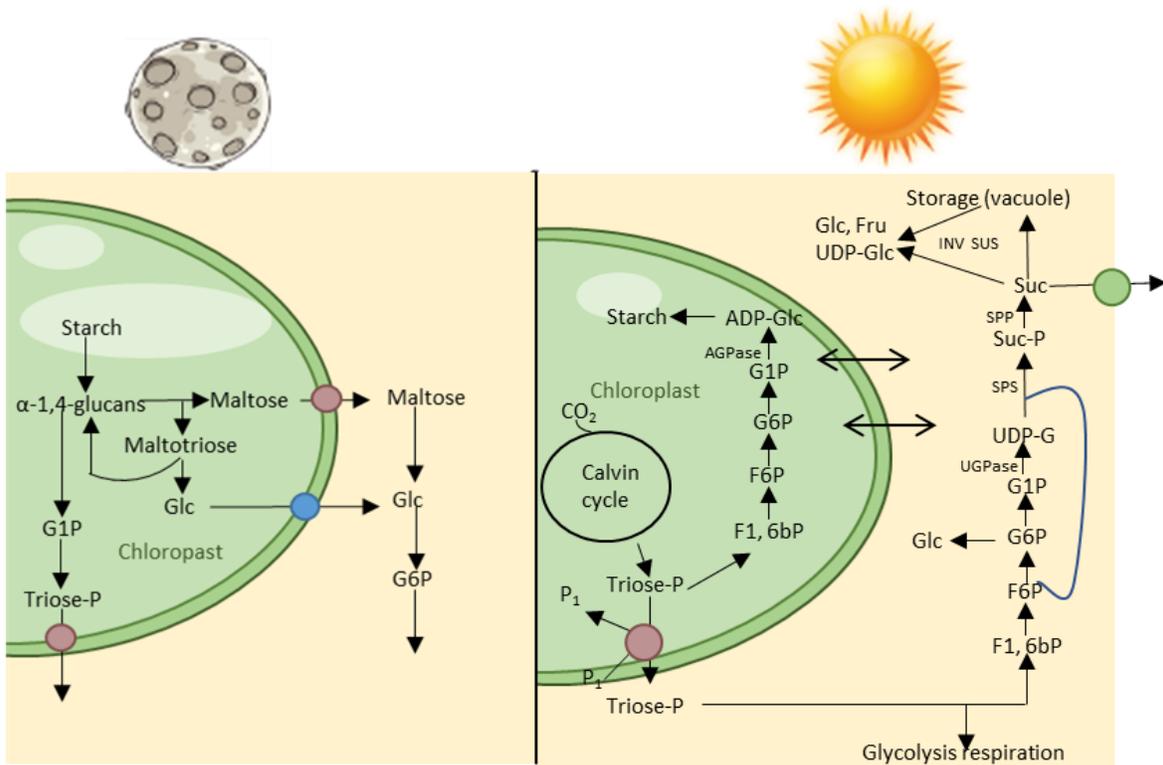


Figura 5. Mecanismo de síntesis de carbohidratos durante la fotosíntesis y en su ausencia. Modificado de Rolland *et al.*, 2006.

El almidón también se acumula en los amiloplastos de órganos de reserva a partir de la sacarosa que exportan los tejidos fotosintéticos (Fig. 6). En este caso, el almidón está destinado a satisfacer necesidades energéticas a largo plazo, por ejemplo, durante la germinación de semillas.

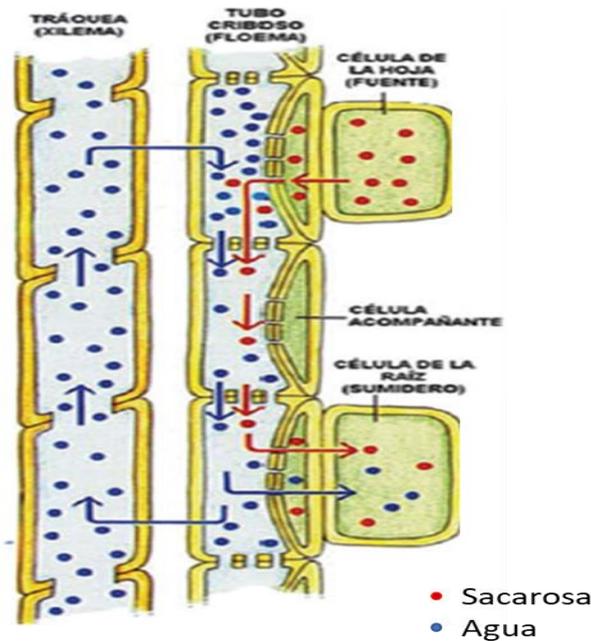


Figura 6. Transporte de sacarosa de los tejidos fotosintéticos a tejidos no fotosintéticos. Modificado de Curtis y Barnes, 1997.

2.5) Amilasas

Las amilasas son un grupo de enzimas capaces de hidrolizar los enlaces éter de polisacáridos. El almidón es degradado a oligosacáridos, disacáridos y monosacáridos, lo que facilita su posterior metabolización (Fig. 7).

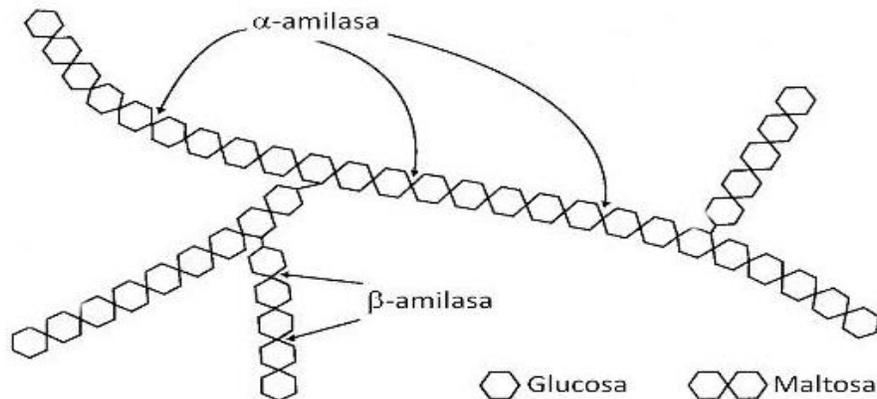


Figura 7. Hidrólisis enzimática de almidón. Modificado de Uhlig H., 1998.

Las amilasas se clasifican en dos tipos: la α -amilasa y la β -amilasa. La actividad de las α -amilasas es dependiente de calcio. Estas enzimas tienen un papel muy importante durante la germinación, en donde participan hidrolizando los enlaces α -1,4 de la amilosa y de la amilopectina presentes en el almidón de las semillas. Por su parte, las β -amilasas son enzimas que atacan los enlaces glucosídicos del extremo no reductor para producir maltosa. Su actividad no es dependiente de calcio y también tienen un papel muy importante en procesos fisiológicos como la germinación y la maduración de los frutos (Vajravijayan *et al*, 2018).

Finalmente, el desarrollo de las semillas de frijol en ocasiones coincide con periodos de condiciones ambientales adversas (sequía, ataque de plagas, etc.), que limitan la disponibilidad de recursos metabólicos necesarios para las semillas en formación. En ese contexto, la movilización de materiales acumulados en la vaina puede constituir un mecanismo que contribuye de manera efectiva a la capacidad de los cultivos de frijol para sobrevivir y producir semillas viables en ambientes hostiles.

En México la variabilidad genética del frijol es muy amplia. Sin embargo, su aprovechamiento eficiente en programas de mejoramiento depende de la caracterización de sus respuestas a condiciones ambientales de interés.

Este trabajo pretende aportar parte de esa información, para lo cual se evaluó si hay una correlación positiva entre la cantidad de azúcares solubles y almidón acumulados en las vainas de 12 genotipos de frijol y los efectos de una deficiencia nutricional severa sobre los atributos nutricionales de las semillas desarrolladas bajo esas condiciones.

3 Hipótesis

En frutos de frijol que al ser cortados de la planta se someten a una limitación severa de nutrientes, la cantidad de azúcares que almacenan las vainas, tienen una relación directa con los contenidos de almidón y proteína presentes en las semillas que se desarrollan bajo esas condiciones.

4 Objetivos

a) Objetivo general

- Evaluar el efecto de una restricción nutricional severa durante el desarrollo del fruto, sobre las cantidades de almidón y proteína acumulados en las semillas de 12 genotipos de frijol.

b) Objetivos particulares

- Determinar los cambios en el contenido de azúcares (almidón, glucosa, fructosa y sacarosa) en las vainas durante el desarrollo de los frutos en 12 genotipos.
- Evaluar la participación de α y β amilasas en la degradación del almidón presente en las vainas.
- Analizar el efecto de una restricción nutricional severa en la cantidad de proteína y almidón en semillas de 12 genotipos de frijol.
- Investigar si existe una correlación entre la cantidad de azúcares presentes en las vainas de los frutos de frijol y el efecto de una restricción nutricional severa sobre el contenido de almidón y proteínas en las semillas.

MATERIALES Y MÉTODOS

A) Instrumentación

Los materiales utilizados a lo largo de la experimentación fueron pesados en una balanza analítica modelo OHAUS ANALYTICAL plus 1711088.

Para la trituración de las muestras se empleó mortero.

La cuantificación de azúcares en placa se hizo en un espectrofotómetro modelo Thermo Scientific Multiskan FC 02336344.

La toma de muestras líquidas se realizó con micropipetas modelo Gilson de 1-10 μL , 20-200 μL y 100-1000 μL . Para una mezcla homogénea de las muestras tratadas se usó un vortex modelo MS1 Minishaker IKA 1973608. La centrifugación de muestras se realizó en una centrifuga modelo Thermo Scientific HERAEUS Pico 21 Centrifuge 02389404. El calentamiento fue realizado en un bloque de baño seco modelo Felisa E079/17.

Para el almacenamiento de las muestras se usaron tubos Eppendorf de 1.5 mL.

B) Método

B.1) Material biológico

Los genotipos evaluados en este estudio fueron los siguientes:

- Flor de Mayo
- G42
- G92
- G60
- Cacahuat
- OTI
- G17
- G15

- G122
- Negro de Tacana
- Raramuri
- G26

Para la germinación las semillas fueron lavadas con etanol y abundante agua, después se desinfectaron remojándolas 5 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 5%. Posteriormente se enjuagaron 3 veces con agua desionizada y se colocaron en un recipiente con papel absorbente previamente humedecido. Se dejaron germinar a temperatura ambiente y en oscuridad. Después fueron trasplantadas a macetas con 3 L de agrolita. Se cultivaron en un invernadero iluminado con luz natural y temperaturas diurna y nocturna de 20-25°C y 15-18°C, respectivamente.

Las macetas se regaron todos los días con agua y cada tercer día con solución de Hoagland que está compuesta con 101.1 g/L de KNO_3 , 236.16 g/L de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 115.08 g/L de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 246.48 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 74.55 g/L de KCl, 61.83 g/L H_2BO_3 , 169.01 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 287.54 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 249.68 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 161.97 g/L de H_2MoO_4 (85% de MoO_3) y 468.2 g/L de NaFeDTPA (10 % Fe) y pH 5.4 (Hoagland y Arnor, 1950).

Las flores se etiquetaron el día en que estuvieron totalmente expuestas y la edad de los frutos se estableció en el número de días después de este momento (DDF).

Se removieron los frutos a los 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 40 DDF y se analizaron los cambios en las vainas y en las semillas en desarrollo.

La restricción nutricional se impuso cortando los frutos a 20 DDF e incubándolos en oscuridad a temperatura ambiente por 20 días, tiempo en el cual algunas semillas fueron capaces de completar su desarrollo fisiológico.

B.2) Cuantificación de proteína en las semillas

Semillas que se desarrollaron en frutos cultivados en condiciones normales, o semillas que lograron completar su desarrollo en los frutos que fueron cortados a los 20 DDF se trituraron hasta obtener un polvo fino. Se pesaron 100 mg y se depositaron en tubos Eppendorf. El material se resuspendió en 1 mL de NaCl 1M y después de homogenizar en un vórtex por 5 min, se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos.

Del sobrenadante se tomaron 5 μ L los cuales se depositaron en una placa para ensayos ELISA.

Simultáneamente se hizo una curva patrón con BSA (a una concentración de 0.5 mg/mL). A cada pozo se le adicionaron 200 μ L de reactivo de Bradford, se llevó a un volumen final de 20 mL con agua y se leyó la absorbancia a 595nm.

B.3) Cuantificación de almidón

B.3.1) Semillas

En este caso se pesaron 100 mg de harina de semillas, el polvo se depositó en tubos Eppendorf y se les adicionó 1 mL de etanol (EtOH) 80 %. El material se resuspendió en vortex, después de lo cual se sometieron a calentamiento a 80°C durante 20 minutos. Una vez que se enfriaron, los tubos se centrifugaron 5 minutos a 10,000 rpm.

El sobrenadante fue desechado y la pastilla se resuspendió en 1 mL de agua. Se calentaron a 80°C por 1 hora.

Para la degradación del almidón 1 g de la enzima amiloglucosidasa: se disolvió en 25 mL de acetato de sodio 250 mM pH 4.5. Después de homogenizar a cada muestra se le adicionaron 250 μ L de esta solución. Las muestras se incubaron a 37°C por 12h después de lo cual se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 minutos. El

sobrenadante se usó para medir glucosa. Con este propósito se preparó una mezcla de reacción que contiene 100 mM Hepes pH 8.0, 50 mM KCl, 0.7 mM NAD, 1 mM ATP, 3 mM MgCl₂, 1 U/mL hexocinasa. En los pozos de una placa para ensayos de ELISA se colocaron 170 µL de esta mezcla de reacción y 10 µL de las muestras digeridas con amiloglucosidasa. Se agitaron y se registró la absorbancia a 340 nm. Posteriormente se adicionaron 10 µL de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) la cual fue preparada mezclando 5.8 U en un mL de Hepes 100 mM pH 8.0. Los componentes se mezclaron y después de 20 minutos se realizó la lectura de la absorbancia a 340 nm. La diferencia de las dos lecturas se usó para calcular la cantidad de glucosa. La cantidad de glucosa se estimó interpolando las lecturas en una curva patrón elaborada con una solución de glucosa 5mM a la que se le realizó el mismo procedimiento.

B.3.2) Vainas

Las vainas de frutos se cortaron en pedazos pequeños y después de congelarlas con nitrógeno líquido se almacenaron a -70°C.

Para las determinaciones el material se pesó y se trituró en mortero con 1mL de EtOH 80%. El material molido se depositó en tubo Eppendorf y se calentó a 80°C durante 20 minutos. Una vez que los tubos se enfriaron, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante obtenido se separó para la cuantificación de azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa), mientras que la pastilla fue procesada de manera similar a lo descrito con la harina de las semillas para la cuantificación de almidón.

B.4) Cuantificación de azúcares solubles

Para eliminar la coloración verde de los extractos etanólicos, a cada tubo se le adicionaron 50 mg de carbón activado. Después de mezclarlo se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 minutos.

La cantidad de azúcares se midió usando un método enzimático basado en la participación secuencial de 4 enzimas: hexocinasa, G6PDH, fosfato glucosa isomerasa (PGI) e invertasa (INV). La mezcla de reacción constituida por 100 mM Hepes (pH 8.0), 50 mM KCl, 0.7 mM NAD, 1 mM ATP, 3 mM MgCl₂, 1 U/mL hexocinasa. Las enzimas G6PDH, e INV se diluyeron en Hepes 0.1 M pH 8.0, para que la concentración final en el ensayo fuera de 1 U/mL.

Los ensayos se hicieron en una placa de ELISA. En cada pozo se pusieron 170 µL de mezcla de reacción y 15 µL de muestra. Después de registrar la absorbancia a 340 nm se adicionaron 10 µL de G6PDH, se incubó 20 minutos a temperatura ambiente y nuevamente se registró la lectura a 340 nm. Posteriormente se agregaron 10 µL de PGI y después de incubar a temperatura ambiente por 20 minutos se registró la lectura a 340 nm. Finalmente se adicionaron 10 µL de INV y después de incubar 20 minutos a temperatura ambiente se registró la lectura final.

Los cambios en las lecturas a 340 nm se usaron para calcular las cantidades de glucosa, fructosa y sacarosa presentes en los extractos; para ello fue necesario hacer curvas patrón con soluciones de glucosa, fructosa y sacarosa.

B.5) Medición de actividad de amilasas

Muestras de vaina de 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 40 DDF se trituraron en 1 mL de buffer de extracción, preparado con MOPS 100mM (pH 7.2), EDTA 1mM, DTT 1mM, etilenglicol 10%. El extracto se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos. Se midió la cantidad de proteína en el sobrenadante y el volumen correspondiente a 20 µg se mezcló con un volumen igual de buffer de carga (preparado mezclando 4.96 mL

de Tris-HCl 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).

Para la preparación del gel separador se mezclaron 1.25 mL de una solución 30:08 % de acrilamida:bisacrilamida, 0.625 mL Tris-HCl 3M pH8.8, 10 mg de amilopectina de papa, 2 µL de CaCl₂ 100 mM, 5 µL de MgCl₂ 100 mM, 75 µL de APS 10 % y 5 µL de TEMED. La amilopectina de papa se disolvió en agua, calentando 10 minutos a 80°C.

Una vez polimerizado el gel separador, el gel apilador se preparó mezclando 0.31 mL de una solución 30:08 % de acrilamida:bisacrilamida, 0.62 mL de Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8), 50 µL de APS 10% y 5 µL de TEMED.

Posteriormente, los pozos del gel se cargaron con 15 µL de muestra y la corrida se llevó a cabo por 4 horas a 75 V. Transcurrido ese tiempo, el gel se incubó 1 hora en 100 mL de buffer para revelado que fue preparado con acetato de sodio 50 mM pH 4.5, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM y DTT 5 mM. Transcurrido ese tiempo, se tiñó con Lugol. La actividad amilolítica se observó como bandas claras sobre un fondo azul oscuro.

B.6) Identificación de amilasas

La identificación de amilasas presentes en las muestras se llevó a cabo por medio de western blot, empleando anticuerpos específicos para α y β amilasas. Con ese propósito extractos proteicos de vainas de 10, 15, 20, 25, 30, 40 DDF se separaron en una electroforesis desnaturizante. Para llevar a cabo la electroforesis se preparó un gel separador compuesto por: 1.25 mL de una solución 30:08 % de acrilamida:bisacrilamida, 0.625 mL Tris-HCl 3M pH8.8, 25 µL de SDS 20 %, 75 µL de APS 10 % y 5 µL de TEMED. Para la preparación del gel apilador se emplearon 0.31 mL de la solución 30:08 % de acrilamida:bisacrilamida, 0.62 mL de Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8), 25 µL de SDS 20 %, 75 µL de APS 10% y 5 µL de TEMED.

El amortiguador de corrida usado contiene Tris-HCl 50 mM (pH 8.4), 192 mM glicina y SDS 0.1%.

Las muestras corrieron a 110 V durante 2 horas. Terminada la separación, el gel se incubó en buffer de transferencia (Tris-HCl 25mM, glicina 52 mM y metanol (MeOH) 20% y pH ajustado a 8.3).

Los componentes del sistema de transferencia después de ser empapados en amortiguador de transferencia se colocan en el orden siguiente: una esponja, papel filtro, el gel donde se encuentran las muestras, la membrana PVDF (la cual dadas sus características hidrofóbicas se humedece previamente en MeOH y posteriormente colocada en el buffer de transferencia) seguida de otra hoja de papel filtro y nuevamente otra esponja. Todo esto se asegura en un dispositivo especial formando así un emparedado. Es importante poner cuidado especial para evitar que entre el gel y la membrana de PVDF se formen burbujas.

La transferencia se hace a 30 mA durante 1 h con agitación constante y se coloca un bloque de hielo para evitar el calentamiento.

Finalizada la transferencia, la membrana se colocó en un recipiente de plástico al cual se le añadieron 20 mL de una solución de leche descremada en polvo (2 %) disuelta en buffer TBST (que contiene 4.84 g/L de trizma-base, 16 g/L de NaCl, 2 mL/L de Tween-20 pH 7.6). La membrana se incubó en agitación constante por 1h a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se agregó el anticuerpo y se incubó a 4°C en agitación continua toda la noche.

Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 20 minutos en agitación constante con buffer TBST. Posteriormente se agregó el anticuerpo secundario (marcado con una actividad de peroxidasa), disuelto en buffer TBST y se incubó 1h con agitación constante a temperatura ambiente. Al concluir se le realizaron nuevamente 3 lavados con buffer TBST.

Por último, a la membrana se le agregó el sustrato que la peroxidasa asociada al anticuerpo secundario convirtió en una señal luminosa, la cual se capturó en un equipo ChemiDoc.

5 Resultados

5.1) Efecto del desarrollo sobre la cantidad de almidón y azúcares solubles en las vainas de los frutos de los genotipos G15 y OTI

La vaina de los frutos de frijol acumula cantidades importantes de azúcares, los cuales pueden participar en el desarrollo de las semillas. Con el fin de evaluar el efecto del genotipo y del desarrollo sobre ese fenómeno, se hizo un análisis del contenido de almidón (Fig. 8), glucosa (Fig. 9), fructosa (Fig. 10) y sacarosa (Fig. 11) en las vainas durante el desarrollo de los frutos en los genotipos G15 y OTI.

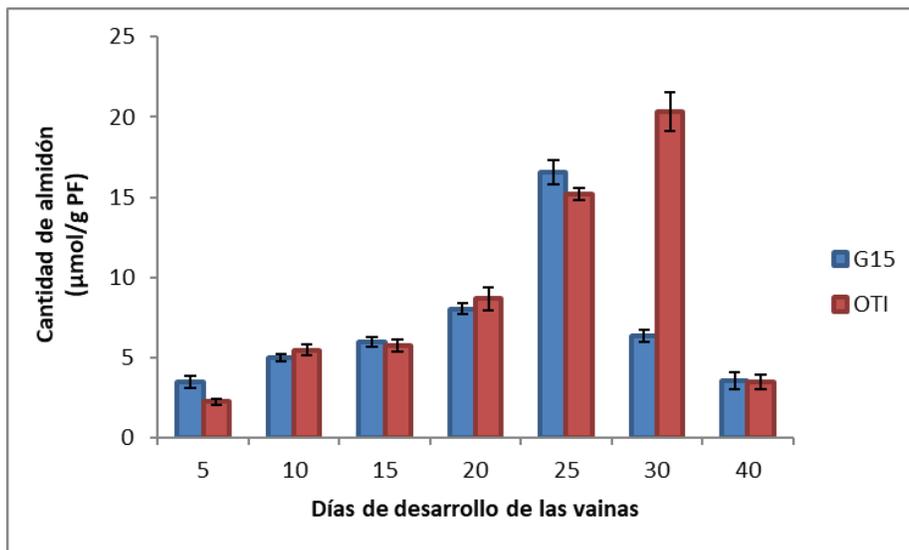


Figura 8. La cantidad de almidón en vainas durante el desarrollo de los genotipos de OTI y G15.

En lo que se refiere a los cambios en la cantidad de almidón (Fig. 8) los resultados muestran un aumento gradual, en el caso del genotipo G15 la mayor cantidad de almidón se detectó a los 25 DDF. Para el genotipo OTI el punto máximo se observó en el día 30 DDF. En ambos casos, después de alcanzar el valor máximo, se observó una disminución gradual.

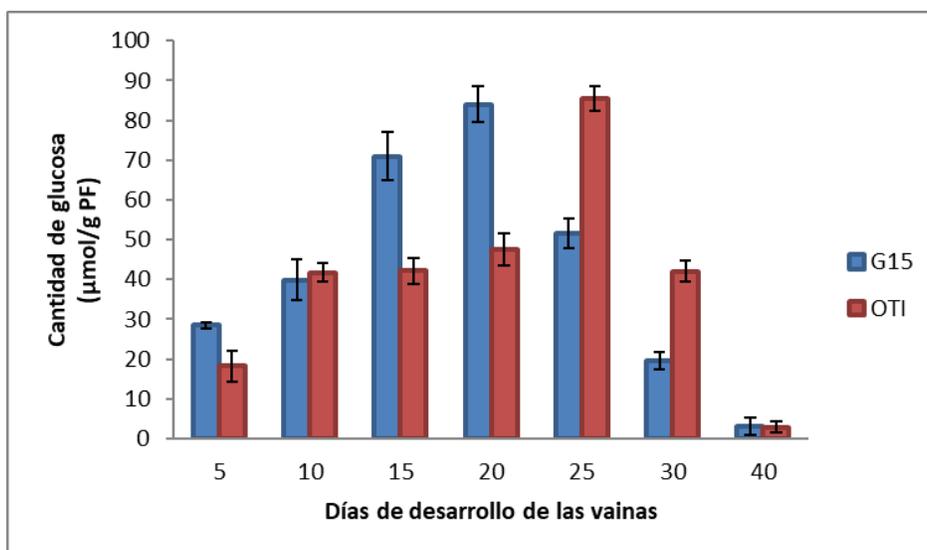


Figura 9. Efecto del desarrollo sobre la cantidad de glucosa presente en la vaina durante el desarrollo de los frutos de los genotipos G15 y OTI.

En la figura 9 se observan los cambios en la cantidad de glucosa presente en las vainas durante el desarrollo de los frutos de los genotipos G15 y OTI. Los resultados obtenidos muestran que en ambos genotipos hay un incremento gradual. En el genotipo G15 la acumulación máxima de glucosa se observa a los 20 DDF, mientras que en el genotipo OTI el punto más alto se presenta a los 25 DDF.

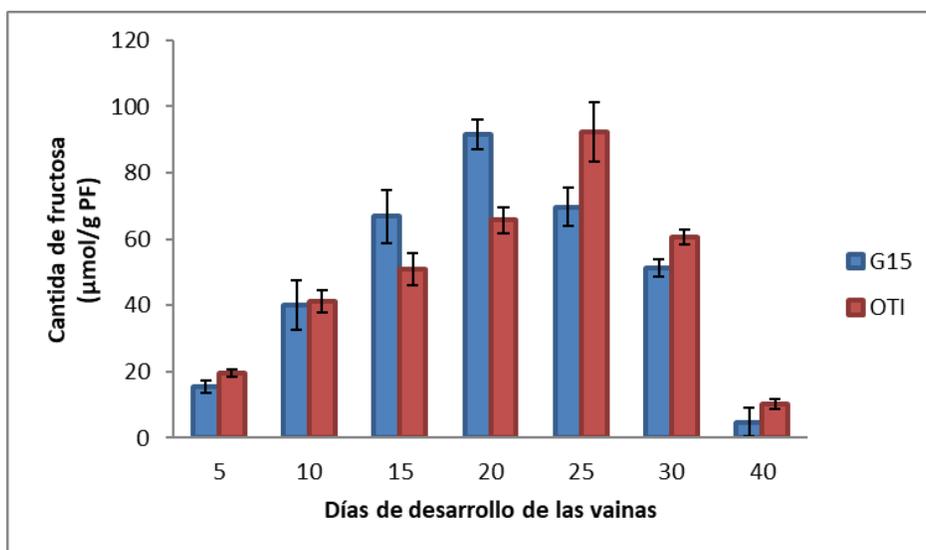


Figura 10. Cantidad de fructosa en vainas de los genotipos G15 y OTI a lo largo del desarrollo de los frutos.

En la figura 10 se observa un aumento gradual de la cantidad de fructosa que se da durante el desarrollo de los frutos. En el genotipo G15 se observa un punto máximo a los 20 DDF, mientras que para el genotipo OTI el valor más alto se presenta a los 25 DDF.

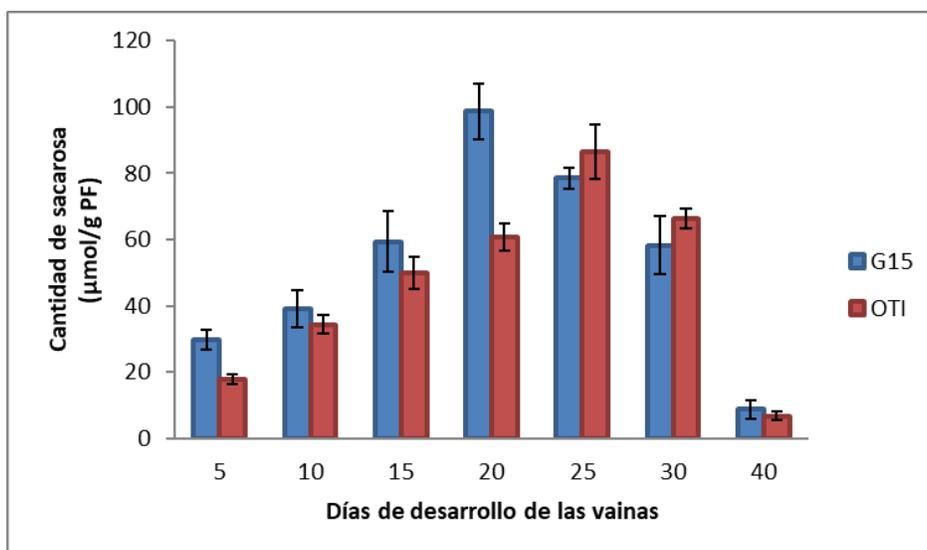


Figura 11. Cantidad de sacarosa presente en las vainas de los frutos de los genotipos G15 y OTI a lo largo de su desarrollo.

En la figura 11 se muestra la cantidad de sacarosa presente en muestras de vaina para genotipo G15 y OTI a lo largo de su desarrollo; G15 presentó un punto máximo a los 20 DDF, mientras que el valor más alto en OTI se observó a los 25 DDF.

Es importante remarcar que las concentraciones de todos los azúcares mostraron una disminución gradual después de alcanzar los puntos máximos y que ambos genotipos mostraron una respuesta similar.

5.2) Actividad de amilasas en las vainas de los genotipos G15 y OTI durante el desarrollo de los frutos

Al analizar el desarrollo de los frutos se observó que la cantidad de almidón se reduce en la parte final del periodo. La siguiente parte consistió en medir la actividad de amilasas y tratar de establecer su participación en el proceso.

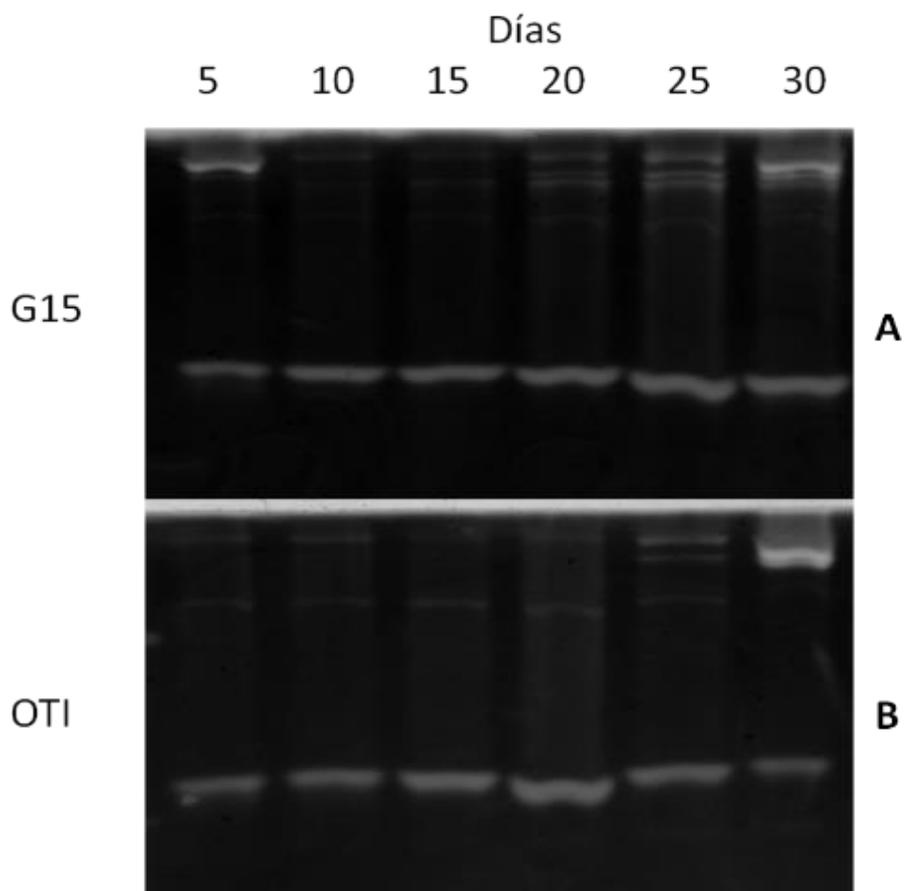


Figura 12. Gel nativo para medir actividad de amilasas en vainas de los genotipos G15 y OTI durante el desarrollo de los frutos.

En la figura 12 se muestra el gel nativo para medir la actividad amilolítica en extractos de vainas durante el desarrollo de frutos de los genotipos G15 y OTI. En el caso del genotipo G15, se observa que a partir de los 20 DDF aumenta la intensidad de una banda que aparece en la parte superior del gel. Un patrón similar se observa en las vainas del genotipo OTI, solo que en este caso el cambio inicia a

25 DDF. Al comparar estos resultados con los obtenidos en la cuantificación de almidón (Fig. 8), se aprecia que la aparición de estas bandas coincide con la degradación acelerada del almidón.

5.3) Análisis de los cambios en la abundancia de α y β -amilasa en vainas durante el desarrollo de los frutos

Con el fin de identificar la naturaleza de las amilasas que participan en la degradación de almidón acumulado en la vaina de los frutos, se usaron anticuerpos específicos para α y β amilasas con los que se evaluaron los cambios en su abundancia durante el desarrollo de los frutos.

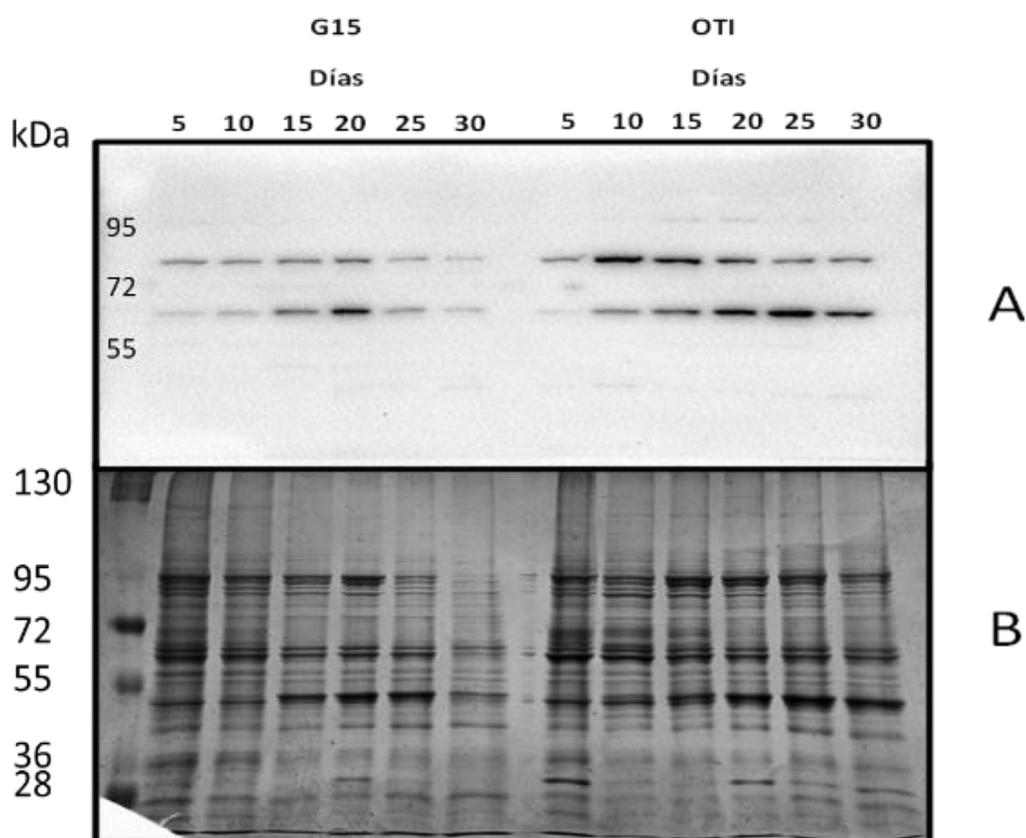


Figura 13. Análisis por western de los cambios en la cantidad de β -amilasas (A) durante el desarrollo de los frutos. (B) Gel desnaturizante en donde se muestran las proteínas presentes en los extractos.

En la figura 13A se presenta un western blot que muestra los cambios en la cantidad de β -amilasa en las vainas de los genotipos OTI y G15 durante el desarrollo de los frutos. Se observa que el anticuerpo reconoce 2 bandas (de 82 y 64 kDa). Al hacer una comparación entre la intensidad de las bandas detectadas por los anticuerpos y la cantidad de almidón presente en las vainas (Fig. 8) se aprecia que en el genotipo G15 no hay relación entre ambas variables, mientras que en las vainas del genotipo OTI, el incremento en la intensidad de la banda de 64 kDa coincide bien con la desaparición del almidón.

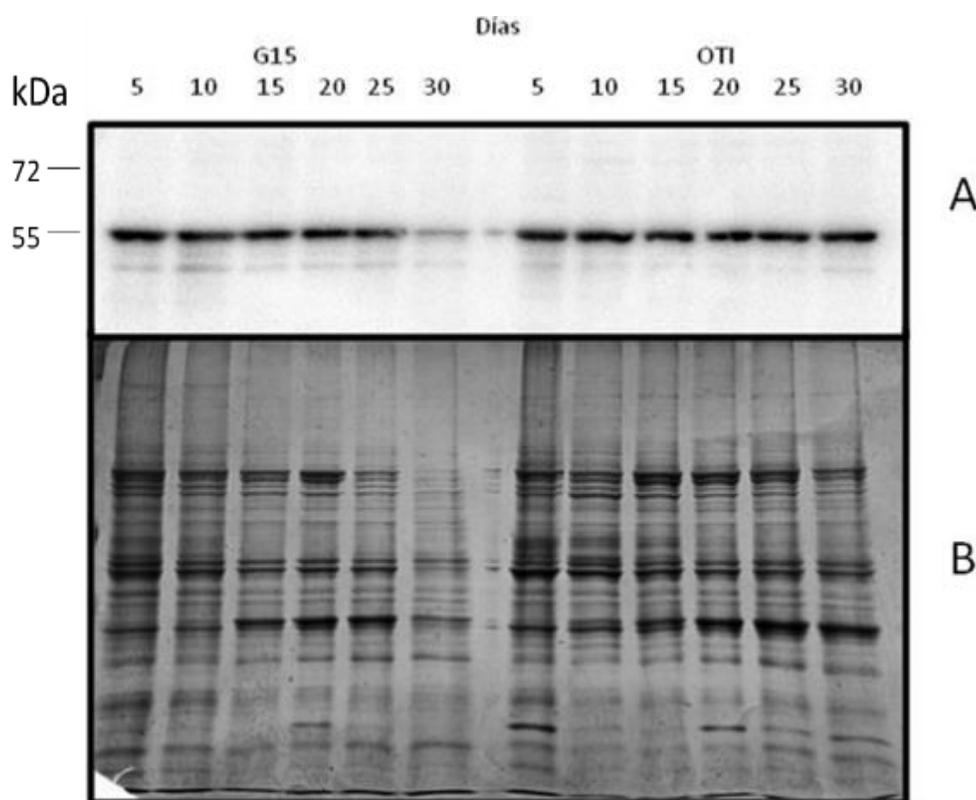


Figura 14. (A) Evaluación por western blot de los cambios en la cantidad de α -amilasa en vainas de los genotipos G15 y OTI durante el desarrollo de los frutos. (B) Gel desnaturizante teñido con azul de Coomasie en donde se aprecian las proteínas presentes en los extractos por 40 días de la planta.

En la figura 14A se muestran los resultados de la evaluación por western blot de los cambios en la cantidad de α -amilasa durante el desarrollo de los frutos en los genotipos G15 y OTI. EL anticuerpo reconoce una banda de 56 kDa, cuya intensidad en el caso del genotipo G15 disminuye en las etapas finales del periodo de desarrollo. En el caso del genotipo OTI, la intensidad de la banda se mantiene elevada a lo largo del periodo analizado.

Los siguientes son resultados de experimentos que se realizaron con el fin de evaluar la importancia de los materiales acumulados en las vainas de los frutos como materiales de reserva que pudieran ser usados para favorecer el desarrollo de las semillas cuando condiciones adversas limitan la disponibilidad de fotosintatos.

5.4) Efecto de la restricción de nutrientes sobre las cantidades de proteína y almidón presentes en la semilla

Frutos en una etapa temprana de su desarrollo (20 DDF) fueron cortados de la planta e incubados en oscuridad por 20 días; bajo esas condiciones algunas semillas fueron capaces de completar su desarrollo. La cantidad de proteína presente en esas semillas se comparó con las de frutos que crecieron normalmente (Fig. 15). Los resultados muestran que la falta de nutrientes produce una reducción en el contenido de proteína que va del 15 al 40 % (Fig. 16).

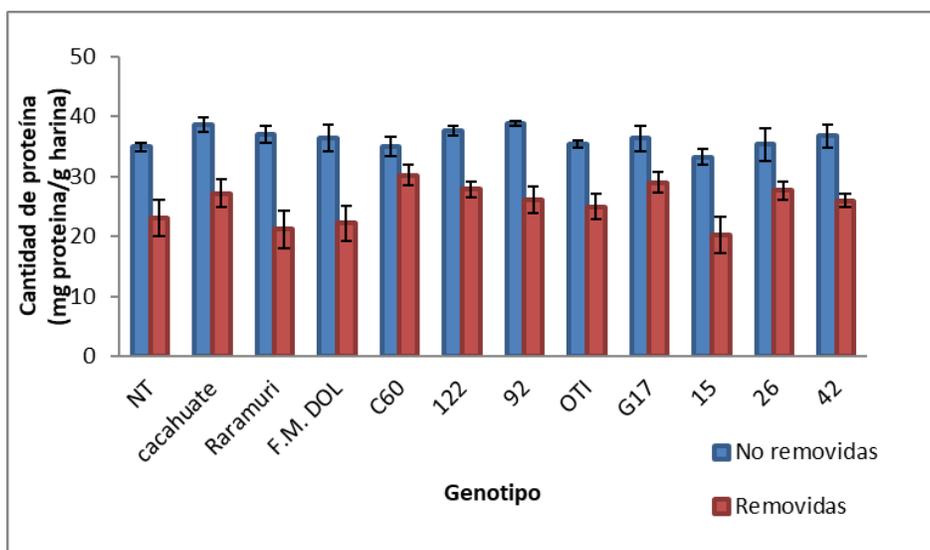


Figura 15. Cantidad de proteína en la semilla de 12 genotipos de frijol que se desarrollaron en condiciones normales o en frutos que fueron cortados de la planta 20 DDF.

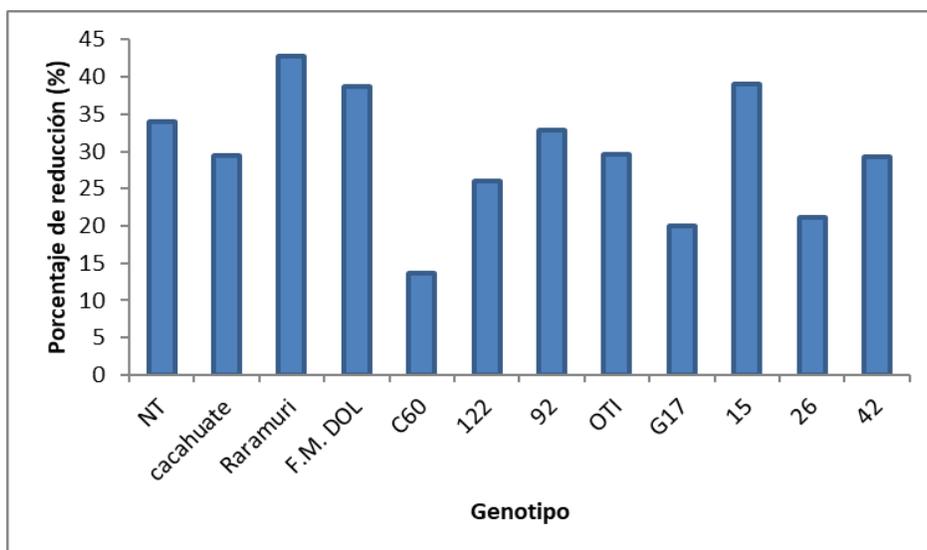


Figura 16. Reducción de la cantidad de proteína (%) como consecuencia de la falta de nutrientes que experimentaron las semillas de 12 genotipos de frijol como consecuencia de cortar los frutos a 20 DDF.

Allí mismo puede verse que la magnitud del efecto negativo es dependiente del genotipo siendo los genotipos C60 y G22 los que presentaron las menores reducciones.

En la figura 17 se presenta el análisis electroforético de las proteínas presentes.

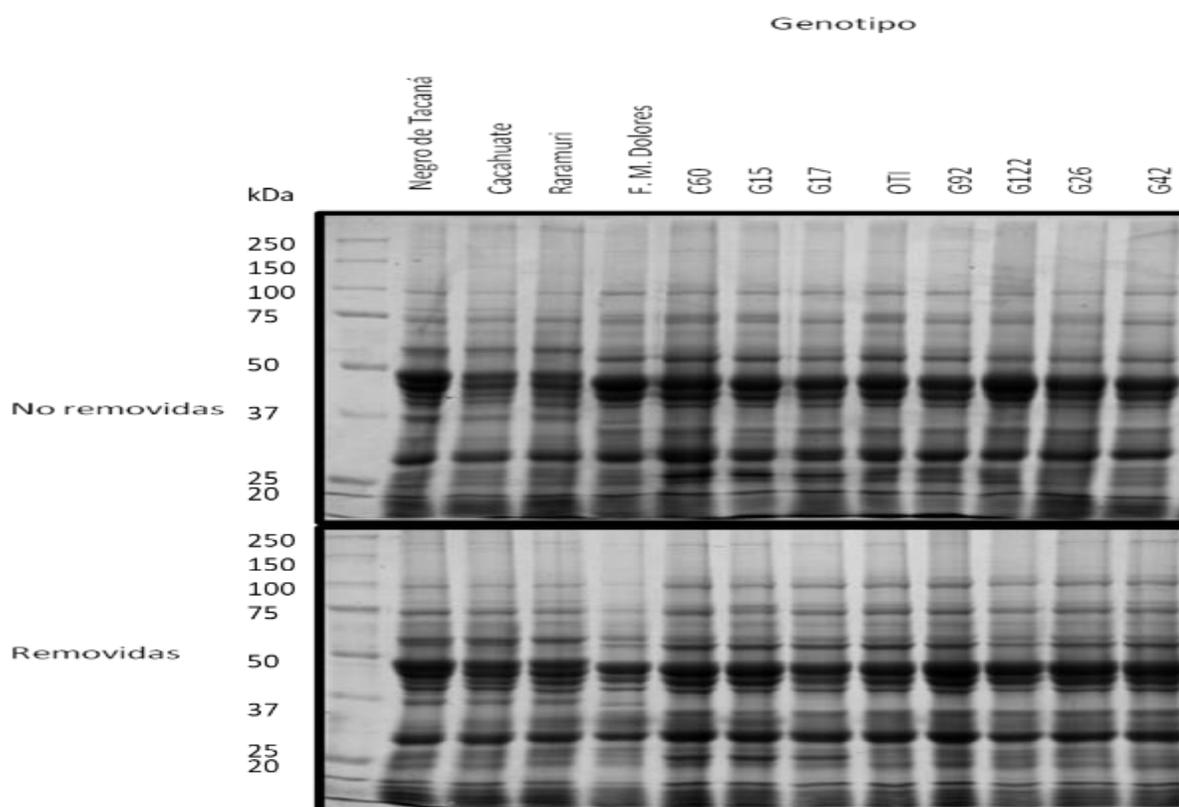


Figura 17. Análisis del efecto de la restricción nutricional severa sobre las características de las proteínas presentes en las semillas de 12 genotipos de frijol.

Las bandas observadas en ambos geles son similares, lo que sugiere que la restricción nutricional no modificó el tipo de proteínas presentes.

El efecto de la restricción nutricional sobre la cantidad de almidón presente en las semillas también fue evaluado (Fig. 18). En este caso la reducción es menor pero igual que con las proteínas, la magnitud de la reducción también es dependiente del genotipo (Fig. 19).

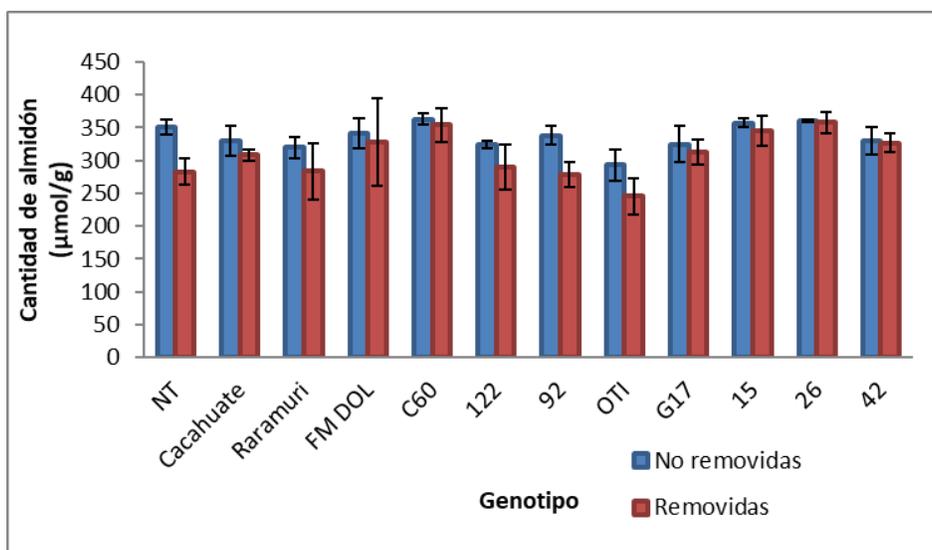


Figura 18. Cantidad de almidón en semillas de 12 genotipos de frijol cuyos frutos fueron cortados a 20 DDF o que se desarrollaron normalmente.

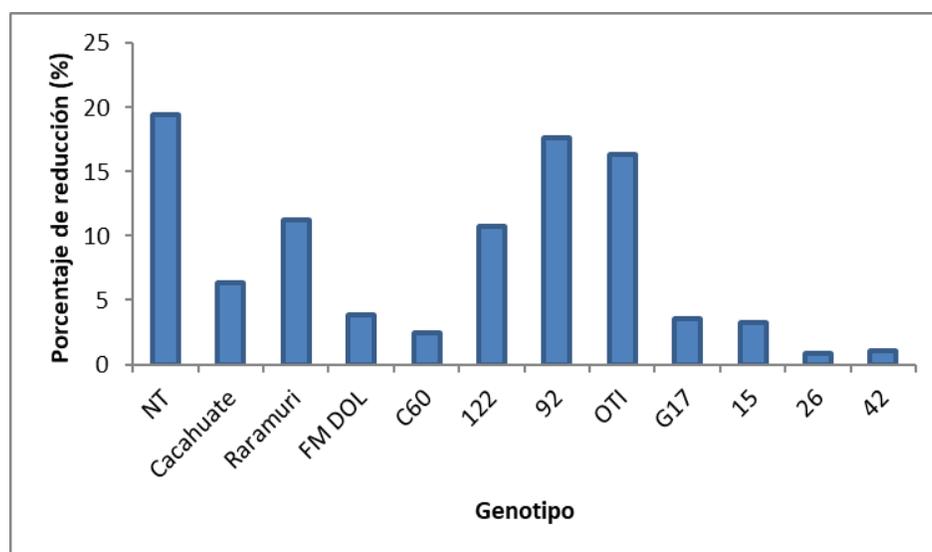


Figura 19. Reducción de la cantidad de almidón (%) en semillas de frijol como consecuencia de la restricción nutricional a la que se sometieron durante su desarrollo.

Las reducciones en las cantidades de almidón y proteína consecuencia de la restricción nutricional a las que fueron sometidas las semillas durante su desarrollo se presenta en la figura 20. Puede observarse que hay genotipos donde la disminución en la cantidad de almidón es pequeña y la reducción en la cantidad de proteína también es modesta. Sin embargo, hay otros los cuales los porcentajes que se redujeron ambos componentes son grandes y bastante similares.

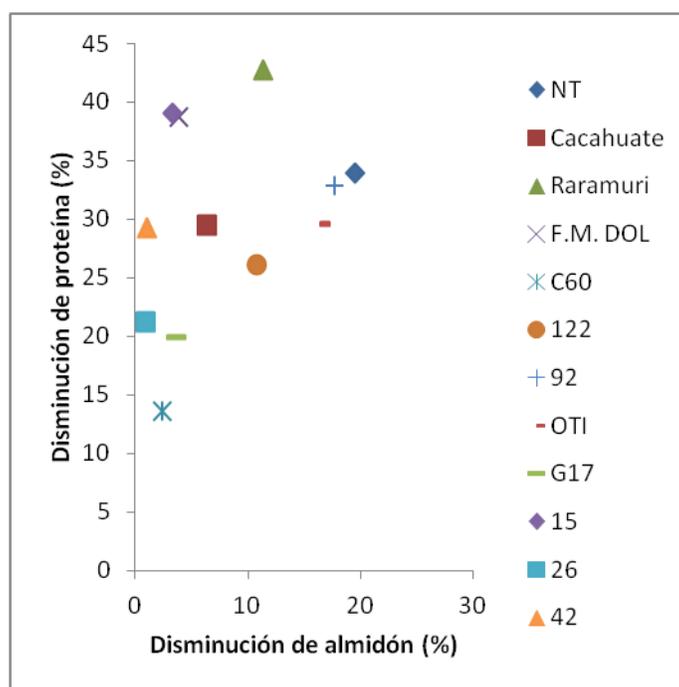


Figura 20. Correlación de las reducciones en las cantidades de almidón y proteína en 12 genotipos de frijol que se sometieron a una restricción nutricional severa durante su desarrollo.

5.5) Análisis de las cantidades de almidón y azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) presentes en las vainas de 12 genotipos de frijol

En el modelo usado para aplicar la restricción nutricional en los frutos que fueron cortados en una etapa temprana del desarrollo de la semilla (20 DDF) e incubados en oscuridad; bajo estas condiciones, el desarrollo que logren las semillas dependerá de las reservas acumuladas en la vaina. Con esta idea en mente, se procedió a medir la cantidad de azúcares presentes en las vainas al momento en que los frutos fueron removidos. En la figura 21 se observa que entre genotipos hay diferencias importantes en la cantidad de almidón presentes en las vainas al momento en que los frutos fueron cortados de la planta.

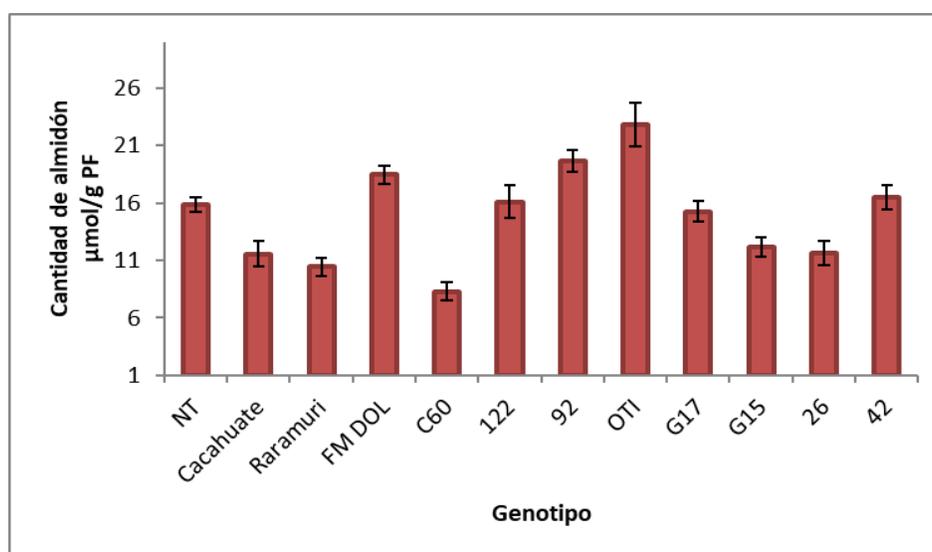


Figura 21. Cantidad de almidón presente en las vainas de frutos de 20 DDF en 12 genotipos. de frijol.

También se midieron cantidades de glucosa (Fig. 22), fructosa (Fig. 23) y sacarosa (Fig. 24).

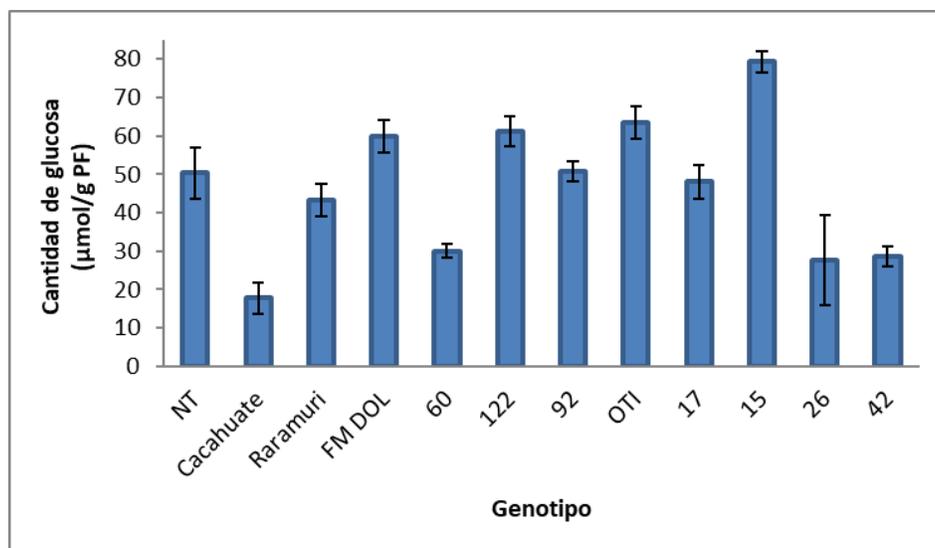


Figura 22. Cantidad de glucosa en vainas de 12 genotipos de frijol.

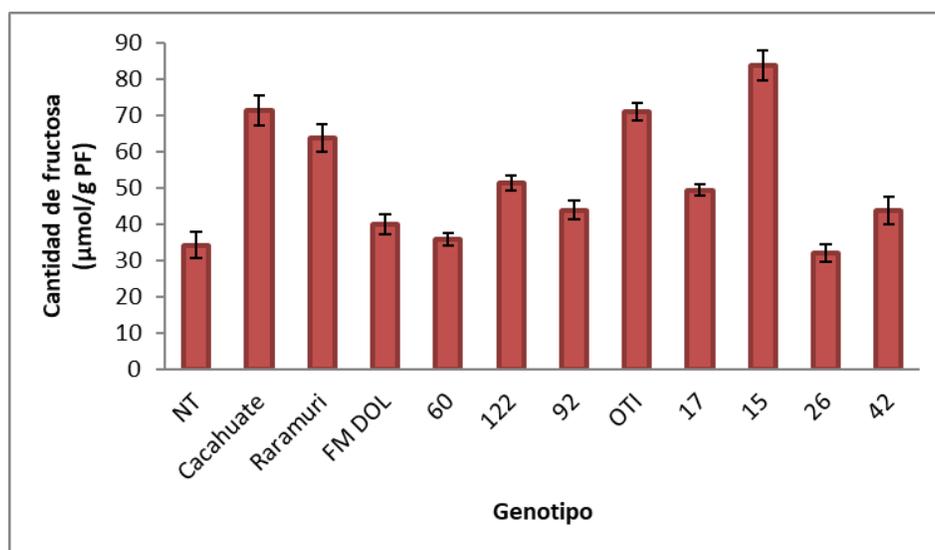


Figura 23. Cantidad de fructosa en la vaina de 12 genotipos de frijol.

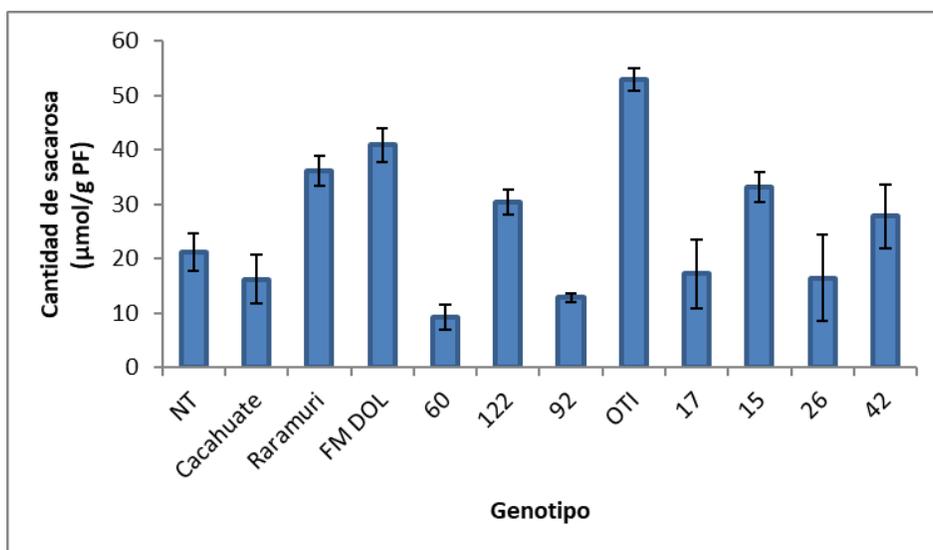


Figura 24. Cantidad de sacarosa en vaina de 12 genotipos de frijol.

Al igual que lo observado con el almidón, en las figuras 22, 23 y 24 se observa que también hay diferencias muy importantes en las cantidades de glucosa, fructosa y sacarosa, respectivamente en las vainas de los genotipos a 20 DDF, que fue el momento que se cortaron los frutos.

La figura 25 muestra la correlación entre la cantidad de azúcares (almidón más azúcares solubles) presentes en la vaina al momento en que fueron cortados los frutos y la reducción en el contenido de almidón en las semillas que se desarrollaron en esas condiciones. En general se observa una tendencia directamente proporcional: a mayor contenido de azúcares en la vaina, mayor es el porcentaje de disminución de almidón en la semilla. Se puede observar que los genotipos 92, NT y OTI tienen un porcentaje de disminución muy alto, mientras que en otros como 26, 42 y C60 la reducción es muy pequeña.

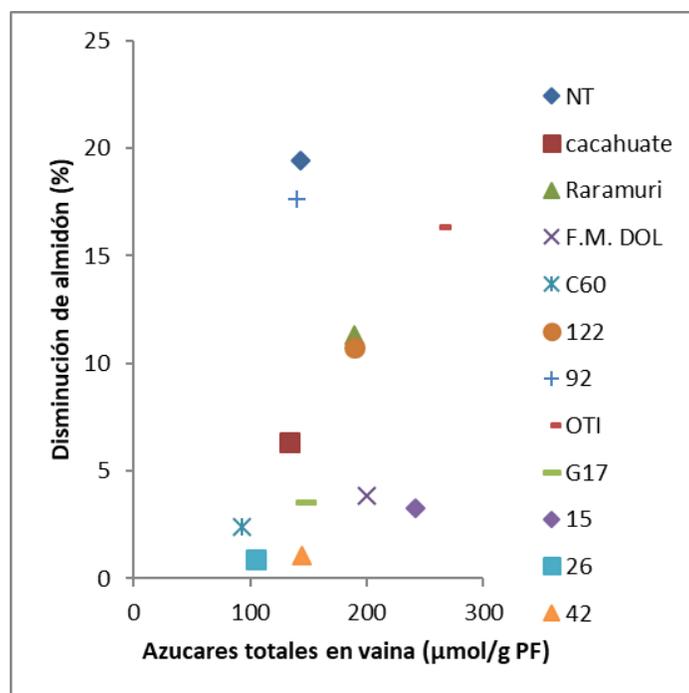


Figura 25. Relación entre la cantidad de azúcares presentes en las vainas de 12 genotipos de frijol a 20 DDF y la disminución en la cantidad de almidón (%) en semillas que lograron desarrollarse en frutos que se cortaron en ese momento.

En la figura 26 se observa la relación que existe entre la cantidad de azúcares totales en la vaina a 20 DDF y la disminución de la cantidad de proteína en las semillas que logran desarrollarse en frutos que se cortan en ese momento. Se puede observar que también existe una correlación directa entre las dos variables. Sin embargo, el efecto es mayor al que se observa en la cantidad de almidón.

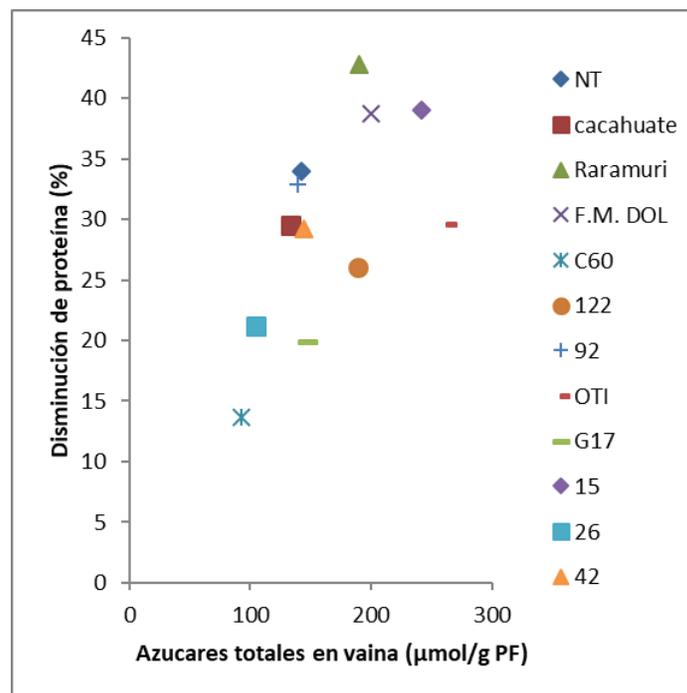


Figura 26. Relación entre la cantidad de azúcares totales presentes en vaina de 12 genotipos de frijol a 20 DDF y la disminución de proteína en las semillas que se desarrollan en frutos que se cortan en ese momento.

6 Discusión

La actividad fotosintética permite a las plantas aprovechar la energía luminosa para sintetizar azúcares, los cuales pueden ser oxidados o usados como precursores de diversos compuestos. No todos los órganos son fotosintéticamente activos; sin embargo, las plantas han desarrollado mecanismos para que, a través de la distribución de sacarosa, todas sus estructuras tengan acceso a los productos de la fotosíntesis. Por otro lado, las plantas pueden enfrentar situaciones como la falta de luz (oscuridad) o condiciones ambientales adversas, que reducen la actividad fotosintética y limitan la disponibilidad de sus productos (Santiago A., 2010). El almidón es un polímero formado por moléculas de glucosa unidas por enlaces α 1,4 y α 1,6 y cuyo metabolismo es importante para el crecimiento óptimo de las plantas (Sitt y Zeeman, 2012). El almidón es usado por las plantas para almacenar los excedentes de carbono fijado por los tejidos fotosintéticos; y su degradación durante la noche garantiza la disponibilidad de carbono reducido para que los procesos metabólicos puedan continuar. El almidón también se acumula en frutos y semillas en donde cumple funciones igualmente importantes. La biosíntesis del almidón involucra la participación de enzimas que muchas veces actúan como complejos multiproteicos y su actividad está sujeta a una regulación cuya complejidad pone de manifiesto su importancia (Muñoz *et al.*, 2006).

Además de los productos fotosintéticos que reciben de las hojas, las vainas de los frutos de frijol son estructuras fotosintéticas, lo que probablemente contribuye a que en ellas se acumulen cantidades muy importantes de almidón y azúcares solubles (Figs. 21, 22, 23 y 24). Nuestros resultados muestran que la cantidad de esos metabolitos dependen de la etapa del desarrollo, y que la etapa en donde las semillas tienen un crecimiento más activo (a partir de los 20 DDF) coincide con la rápida disminución de las cantidades de todos ellos.

La degradación de almidón involucra la participación de α y β -amilasas cuyo papel depende tanto del desarrollo, como de las condiciones en que se encuentran las plantas (Müntz, 1977 y Beers, *et al.*, 1990). La evaluación por western blot de la abundancia de α y β -amilasas (Figs. 13A y 14A) muestra que salvo la banda reconocida por el anticuerpo contra de β -amilasa en el genotipo OTI, los cambios en las otras bandas reconocidas por ambos anticuerpos no tienen una correlación positiva con la degradación del almidón. Esto sugiere otros mecanismos podrían participar en la regulación de sus actividades.

El hecho de que las cantidades de almidón y azúcares solubles presentes en la vaina de los frutos se reduzcan cuando la semilla entra en la fase rápida de acumulación de sustancias de reserva (Figs. 8, 9, 10 y 11), sugiere que la vaina además de proteger a las semillas en desarrollo también funciona como un reservorio de nutrientes. Con el fin de probar esa hipótesis, se cortaron frutos de 20 DDF y se incubaron en oscuridad. Bajo esas condiciones, el desarrollo de las semillas depende del reciclaje de los recursos acumulados en la vaina. Nuestros resultados muestran que en las semillas desarrolladas bajo esas condiciones hay una disminución importante en las cantidades de almidón y proteína (Figs. 15 y 18). La reducción fue mayor en la cantidad de proteína y la respuesta es claramente dependiente del genotipo. Sin embargo, estas variables no siempre están correlacionadas: hay genotipos en donde las reducciones en proteína y almidón son elevadas, mientras que otros tienen reducciones relativamente pequeñas en la cantidad de almidón y disminuciones muy importantes en la cantidad de proteína (Fig. 20). Es probable que esto se deba al menos en parte, a que la síntesis de proteínas es energéticamente más costosa que la de almidón.

Cuando se correlacionaron las cantidades de azúcares presentes en las vainas con la magnitud de las reducciones en las cantidades de almidón y proteína que experimentaron las semillas que se desarrollaron en frutos que se removieron a 20 DDF, los resultados obtenidos son contrarios a lo esperado: en general entre más alto es el contenido de azúcares en las vainas, más grande es la reducción en las

cantidades de almidón (Fig. 25) y proteína (Fig. 26) en las semillas desarrolladas. Estos resultados hablan de una incapacidad para canalizar eficientemente los recursos metabólicos de las vainas al desarrollo de las semillas.

7 Conclusiones

La vaina de los frutos de frijol es un órgano que además de proteger a las semillas, acumula cantidades importantes de azúcares (almidón, glucosa, fructosa y sacarosa) que son utilizados para el desarrollo de las semillas.

La velocidad con la que se degrada el almidón acumulado en las vainas no tiene una relación directa con la intensidad de las bandas de proteínas reconocidas por anticuerpos contra α y β amilasas.

La restricción nutricional que afectó a los frutos que fueron cortados 20 DDF, redujo la cantidad de almidón y proteínas en las semillas; sin embargo, la cantidad de proteína fue mayormente afectada.

Los genotipos acumulan grandes cantidades de azúcares solubles en las vainas, pero bajo condiciones de restricción nutricional severa parecen ser incapaces de hacer una transferencia eficiente de esos recursos a las semillas en desarrollo.

Prácticamente todas las respuestas obtenidas son dependientes del genotipo, lo que demuestra la existencia de variabilidad genética que podría ser usada en programas de mejoramiento.

8 Perspectivas

Este proyecto muestra que el papel de la vaina no se limita a proteger a las semillas; ésta estructura acumula azúcares que son usados por las semillas en desarrollo, Nuestros resultados muestran que existen grandes diferencias entre genotipos y esa variabilidad genética podría ser usada en programas de mejoramiento para obtener variedades que a partir del uso de los azúcares acumulados en la vaina pudieran tolerar de mejor manera condiciones adversas. Sin embargo, nuestros resultados también muestran que los genotipos que acumulan más azúcares parecen ser incapaces de transferirlos eficientemente a las semillas en desarrollo. Sin duda será interesante investigar las bases moleculares de esa limitación.

9 Referencias bibliográficas

- [1] Agama-Acevedo, Edith, Juárez-García, Erika, Evangelista-Lozano, Silvia, Rosales-Reynoso, Olga L., & Bello-Pérez, Luis A.. (2013). Características del almidón de maíz y relación con las enzimas de su biosíntesis. *Agrociencia*, 47(1), 01-12. Recuperado en 08 de marzo de 2019, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952013000100001&lng=es&tIng=es.
- [2] Beers, E., Stanley, D., 1990. Characterization of α -amylase from Shoots and Cotyledons of pea (*Pisum stivum* L.) Seedlings. *Plant physiology*. 92, 1154-1163.
- [3] Bennet E., Roberts J., Wagstaff C., 2011. The role or the pod in seed development: strategies of manipulating yield. *New Phytologist*, 190, 838-853
- [4] Borthwick HA, Hendricks SB, Parker MW, Toole EH, Toole VK. 1951. A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 38: 662–666.
- [5] Cárdenas, F.A. 2000. "Investigación agrícola sobre frijol en México durante el periodo 1943 a 1980", en *Agricultura Técnica en México* 26:63-78.
- [6] Feller U., Fisher A., 1994. Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Critical Reviews in plant science* 13: 241-273.
- [7] Fuhrmann J, Johnen T, Heise KP. 1994. Compartmentation of fatty acid metabolism in zygotic rape embryos. *Journal of Plant Physiology* 143: 565–569.
- [8] Gálvez, Amanda, Gabriela Salinas **"El papel del frijol en la salud nutrimental de la población mexicana"** Revista Digital Universitaria [en línea]. 1 de febrero de 2015, Vol. 16, No.2 [Consultada:]. Disponible en Internet: <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num2/art12/index.html>> ISSN: 1607-6079.
- [9] Gattolin S, Alandete-Saez M, Elliott K, Gonzalez-Carranza Z, Naomab E, Powell C, Roberts JA. 2006. Spatial and temporal expression of the response regulators

ARR22 and ARR24 in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 57: 4225–4233.

[10] Harvey D. 1973. The Translocation of ^{14}C -photosynthate in *Pisum sativum* L. *Annals of Botany* 37: 787-794.

[11] Hernández-López, Víctor M., Vargas-Vázquez, Ma. Luisa P., Muruaga-Martínez, José S., Hernández-Delgado, Sanjuana, & Mayek-Pérez, Netzahualcóyotl. (2013). Origin, domestication and diversification of common beans: Advances and perspectives. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(2), 95-104. Recuperado en 20 de agosto de 2018, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000200002&lng=es&tlng=en.

[12] Hoagland, D., Anor, R. (1950). The water culture method for growing plants without soil. Circular. California Agricultural Experiment Station, 347.

[13] Muntz, K., 1977. Isoenzymes of α -amylase during pod development of field beans. *Phytochemistry*, 1977, Vol. 16. Pp. 1491-1494.

[14] Muñoz, F., M. Morán Zorzano, N. Alonso-Casajús, E. Baroja Fernández, E. Etxberria y J. Pozueta- Romero. 2006. New enzymes, new pathway an alternative view on starch biosynthesis in both photosynthetic and heterotrphic tissues of plants. *Biocatalysis and Biotranformation* 24 (1-2), 63-76.

[15] Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J. (2006) Sugar Sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol*.

[16] SAGARPA, primera edición (2017) Planeación Agrícola Nacional 2017-2030 consultado el 20 de agosto del 2018, disponible en https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256428/B_sico-Frijol.pdf

[17] Santiago A. V., Aspectos básicos de la fisiología en respuesta a estrés y el clima como condicionamiento de este en las plantas. (2010) disponible en <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Aspectosb%C3%A1sicosfisiolog%C3%ADarespuestaestr%C3%A9s..pdf>

- [18] Sotelo, A., Sousa, H. & Sánchez, M. *Plant Food Hum Nutr* (1995) 47: 93.
<https://doi.org/10.1007/BF01089257>
- [19] SINGH, S. P., H. Teran, C. G. Munoz and J. C. Takegami, “Two cycles of recurrent selection for seed yield in common bean”, *Crop Science*, 1999, 39, pp. 391–397.
- [20] Stitt, M., Zeeman, S., 2012. Starch turnover: Pathways, resgulation and role in growth, *Current Opinion in Plant Biology*, 15(3), 282-292.
- [21] Streb, S., & Zeeman, S. C. (2012). Starch Metabolism in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 10, e0160.
<http://doi.org/10.1199/tab.0160>
- [22] Uhlig, H. (1998) *Industrial Enzymes and Their Applications*. John Wiley and Sons, Inc., New York, 435.
- [23] Vajravijayan, S., & Pletnev, S. (2018). Structural insights on starch hydrolysis by plant β -amylase and its evolutionary relationship with bacterial enzymes. *International Journal of Biological Macromolecules*.