

125

24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESTRUCTURA E HISTOQUIMICA DE LA SEMILLA  
MADURA DE DOS VARIETADES DE *Phaseolus vulgaris*  
L. CON UN 50 % DE IMBIBICION. EN RELACION  
AL FENOMENO DEL ENDURECIMIENTO**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**GUADALUPE DEL C. MATEOS CASTAÑEDA**

MEXICO, D. F.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1991



## **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 está 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.

## CONTENIDO

I.	RESUMEN.....	4
II.	INTRODUCCION.....	6
III.	ANTECEDENTES	
	1. Ubicación y descripción taxonómica de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	10
	2. Descripción botánica de la familia Leguminosae.....	11
	3. Importancia económica de la Familia Leguminosae.....	12
	4. Descripción botánica del frijol.....	14
	5. Descripción de la semilla.....	16
	6. Descripción del Sistema Radical.....	17
	7. Descripción del vástago o porción aérea.....	17
	8. Descripción de la flor y el fruto.....	19
	9. Importancia del frijol en México.....	20
	10. Variedades de frijol autorizadas para la época de siembra en la República Mexicana.....	25
	11. Cambios estructurales durante la imbibición.....	29
	12. Problemas del endurecimiento.....	30
	12.1 Estudios cualitativos.....	31
	12.2 Estudios estructurales.....	31
	A. Trabajos con Microscopía Fotónica.....	32
	B. Trabajos con Microscopía Electrónica de Barrido.....	34
	C. Trabajos con Microscopía Electrónica de Transmisión.....	36
	12.3 Estudios bioquímicos.....	36
IV	OBJETIVO.....	39
V.	MATERIAL Y METODO.....	40
	1. Determinación del porcentaje de imbibición.....	40
	2. Procesamiento de muestras para Microscopía Óptica.....	41
	2.1 Pruebas histoquímicas.....	42
	3. Procesamiento de muestras para Microscopía Electrónica de Barrido.....	42
	4. Procesamiento para la Extracción del almidón.....	43
VI.	RESULTADOS	
	1. Porcentaje de Imbibición.....	45

2. Morfología Externa.....	45
3. Microscopía de Campo claro.....	46
3.1 Anatomía.....	46
3.2 Pruebas Histoquímicas.....	50
4. Microscopía Óptica con Sistema de Polarización.....	52
5. Microscopía Electrónica de Barrido.....	52
6. Extracción del almidón.....	53
VII. DISCUSION.....	59
VIII. CONCLUSION.....	64
IX BIBLIOGRAFIA.....	68

## RESUMEN

El frijol en nuestro país ocupa el  
importancia como alimento básico después de  
variedades que se consumen hay preferencia  
culinarias: sabor y tiempo de cocción; estas  
afectadas por el fenómeno del endurecimiento.  
utilizó microscopía fotónica (MF) y electrón  
para estudiar la estructura e histoquímica  
frijol: Michigan 800 (Mi) y Ojo de Cabra (Oc)  
en agua. Mi presenta un tiempo de cocción a c  
se deteriora más rápidamente durante  
propósito del presente estudio fue  
estructurales entre estas dos variedades al  
compararlas con las encontradas en estado  
estudio previo del mismo proyecto  
determinaron dimensiones del grano y del  
y obliterado; coeficiente de absorción  
histoquímica de los tejidos y se cuan  
resultados mostraron las siguientes dife  
promedio del grano; Mi tiene 0.83cm de lar  
0.47cm de grosor. Oc tiene 1.19cm de larg  
0.49cm de grosor. Las dimensiones del hilic  
largo y 0.11cm de ancho; en Oc 0.24cm  
ancho. Oc presentó el micrópilo obliterado  
18%.

El coeficiente de absorción de agua f  
el 50% de imbibición en 1:50 hrs. y Oc  
reacción positiva para la prueba de taninos  
células del esclerénquima en empalizada d  
acumulaciones presentes en la región de  
reacción fue negativa. En ambas varie  
pruebas histoquímicas para polisacáridos  
región hilar; hay calcio en paredes cō  
cotiledones. El grano tiene dos cutículas,

## INTRODUCCION

El frijol, para el pueblo de México, juega un papel muy importante ya que es uno de los alimentos básicos por la tradición de su cultivo. Los antiguos mexicanos lo llamaban 'etl' y lo cultivaban desde la época anterior a la conquista (Ruiz, et al., 1950).

Generalmente lo sembraban y lo siguen sembrando acompañado con semillas de maíz, es decir, frijol y maíz, forman un binomio de gran importancia socioeconómica (Ruiz, et al., 1950; Kohashi, 1990), ya que en muchas regiones ambos cultivos se siembran asociados y participan en la alimentación de nuestro pueblo. Como alimento básico es una fuente importante de proteínas y carbohidratos, además de algunas vitaminas (tiamina, riboflavina, y niacina) y minerales (Calcio y Magnesio) (Ruiz, et al., 1950 y Díaz de León, 1989).

De los frijoles cosechados una parte es utilizado como grano, es decir, para consumo alimenticio humano o de animales de granja; y la otra parte se utiliza como semilla para el siguiente período de siembra (CIAT, 1987). Los granos que son para consumo humano se almacenan y durante este período las semillas de frijol tienden a endurecerse. Un frijol duro no es bien aceptado por los comerciantes y las anas de casa, debido a que tardan más en ablandarse y requieren de mayor gasto de combustible para su cocimiento (Stanley y Aguilera, 1985; Ramírez, 1987; Díaz de León, 1989).

Se han hecho estimaciones a nivel internacional sobre las

pérdidas postcosecha, debido a los problemas antes mencionados; los cuales señalan que en términos generales se pierde un 5% de la cosecha mundial de granos, antes de llegar al consumidor. Pero la magnitud de las pérdidas puede variar de un país a otro, de un año a otro, e inclusive de una entidad a otra; considerándose que en países subdesarrollados (y en algunos países de América del Sur y África) las pérdidas son de alrededor del 30% y 40% de la cosecha anual de granos, y en algunas ocasiones pueden ser mayores dependiendo de las condiciones climáticas que prevalecen durante y después de la cosecha (Moreno, 1986).

Las causas del fenómeno del endurecimiento no son bien conocidas, sin embargo actualmente se proponen las siguientes:

§ Tendencia natural a envejecer

§ Condiciones de almacenamiento inapropiadas (periodos largos en una atmósfera de temperatura y humedad relativa alta) (Gómez, 1982; Moscoso, et al., 1984; Holberg y Stanley, 1987; Moreno y Ramírez, 1987; Díaz de León, 1989; Ramírez, 1990).

§ Modificación de algunos constituyentes químicos (lípidos, proteínas, almidón, pectinas, fitina, iones divalentes, polifenoles -taninos y flavonoides-) (Sefa-Dedeh y Stanley 1979a; Elías, 1982; Moscoso, et al. 1984; Stanley y Aguilera, 1985; Holberg y Stanley, 1987).

§ La presencia de Aminoácidos aromáticos libres (Holberg y Stanley, 1987).

Actualmente se conocen varios estudios sobre las posibles causas del endurecimiento, pero con respecto a cambios estructurales existen muy pocos. y los que se han publicado sólo

nos muestran la no separación de las células cotiledonarias durante la cocción en frijoles duros, las células permanecen unidas por la lámina media (Jones y Boulter, 1983; Stanley y Aguilera, 1985; Aguilera, et al. 1986; Van Buren 1986). Hasta el momento solo se han realizado estudios trabajando semillas de frijol de una sola variedad, comparando la cocción en estado fresco y después de almacenados (en diferentes tiempos y condiciones) observando así los cambios ocurridos en la estructura.

No se han reportado muchos trabajos comparando semillas de diferentes variedades; los únicos autores en México que lo han hecho son Ramírez (1990), donde reporta que el tiempo de cocción varía dependiendo de la variedad y las condiciones de almacenamiento. Además menciona que hay reversión del fenómeno del endurecimiento reduciéndose notablemente el tiempo de cocción de algunas variedades; esto se logró volviendo a almacenar el frijol a menor temperatura (15 C). Cabe mencionar que sus trabajos solo son sobre comportamiento en almacén, susceptibilidad a endurecerse de diversas variedades y a pesar de haber realizado estudios comparativos en frijol, no realizó estudios de microestructura de los mismos. Otro autor que menciona que el fenómeno del endurecimiento puede ser revertido en frijol y chícharo es Hentges, et al. (1990) donde los vuelve a almacenar variando las condiciones de almacenamiento, bajando la temperatura y aumentando la humedad relativa. Por esto se consideró que era necesario realizar más estudios de la semilla de frijol, en estructuras tales como cubierta seminal, hilio y cotiledones en una variedad

susceptible y otra resistente al endurecimiento, en frijoles recién cosechados: secos, en remojo (50% y 100%) y después de la cocción, de las que se cultivan y consumen en nuestro país; con el fin de establecer si existen o no diferencias estructurales e histoquímicas entre ellas. Aunque en el presente trabajo solo se enfoca para trabajar la estructura durante el estado de remojo del 50%.

## ANTECEDENTES

### 1. Ubicación y Descripción Taxonómica de *Phaseolus vulgaris* L. (Cronquist, 1981).

División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae (antes Leguminosae)
Género	<i>Phaseolus</i>
Especie	<i>P. vulgaris</i> L.

## 2. Descripción Botánica de la Familia Leguminosae (leguminosas)

En la familia leguminosae se encuentran representados todo tipo de hierbas, tanto anuales como perennes, arbustos, enredaderas y árboles que viven en climas tropicales y templados. Sus raíces se encuentran provistas de nudosidades distribuidas en la parte superior y media del sistema radical, debido a la asociación con bacterias como la del género *Rhizobium* sp. que vive en simbiosis con el frijol (*Phaseolus* sp.). Estas bacterias permiten la fijación biológica del Nitrógeno atmosférico lo que hace que esta familia ocupe un lugar privilegiado en relación con el mantenimiento de la fertilidad del suelo (Sánchez, 1978; Rzedowski y Rzedowski, 1979; Weier, et al., 1980).

Las hojas son alternas, generalmente compuestas, pinnadas y con estípulas. Poseen flores hermafroditas, con cáliz y corola; ésta última dialipétala, de simetría radiada o cigomorfa; generalmente la inflorescencia es racimosa. El fruto es una vaina dehiscente o indehiscente con una o varias semillas, la cual no se encuentra en ninguna otra familia de plantas. Las semillas carecen de endospermo o bien éste queda reducido a una capa delgada (Ruiz, et al., 1950; Sánchez, 1978; Engleman, 1979; Rzedowski y Rzedowski, 1979).

Es una familia que cuenta con más de 550 géneros y unas 15 000 especies distribuidas en todo el globo (Sánchez, 1978). Esta familia comprende tres subfamilias de importancia: Papilionadas, Casalpinoideas y Mimosoideas. En las tres subfamilias se presentan semillas endospermicas (Corner, 1951). El

frijol pertenece a la subfamilia Papilionadae (Ruiz, 1950; Sánchez, et al., 1978; Rzedowski y Rzedowski, 1979). La palabra leguminosas proviene del latín leguminosus y este de legumen que significa legumbre (Moreno, 1984).

### 3. Importancia económica de la Familia Leguminosae

La familia leguminosae es la segunda que provee más semillas como alimento, se destaca por el número elevado de especies útiles y la variedad de productos que suministra a la economía humana; Por otra parte comprende pocas especies nocivas o invasoras (Rodríguez y Porras, 1985; Esau, 1987).

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) que pertenece a esta familia, es un cultivo básico para los pequeños agricultores en muchos países de América y Africa Tropical, donde representa una forma importante de subsistencia para muchos millones de personas, siendo parte de su sistema de cultivo y de su dieta. Por su bajo precio el frijol juega un papel crítico en la nutrición de las familias con escasos recursos, ya que en algunos casos proporciona hasta una tercera parte del total de la proteína (CIAT, 1987).

Hay leguminosas que se cultivan para grano comestible como son: chícharo, frijol, haba, lenteja, soya, cacahuate, etc. También se utilizan para consumo por el contenido de aceites (como la soya); y se consumen secas por su alto contenido proteico (Stanley y Aguilera, 1985). Se utilizan para forraje y como abono verde: la alfalfa, trébol, carretilla, cacahuate, haba, soya y lenteja entre otras. Cabe mencionar que el haba silvestre además de utilizarse como forrajero se usa para control de malas hierbas.

Hay otras especies de leguminosas que son aprovechadas por sus maderas como el subín que se usa para durmientes de ferrocarril, o el huizache que se usa como leña, además de ser comestible y de extraerse perfumes. Hay otras como el machiché que se usa para durmientes del metro.

Además para mantener la fertilidad de suelos se usa el trébol rojo y el trébol alsike. También el frijol se utiliza con éstos fines, ya que al presentar nódulos bacterianos en sus raíces permite la fertilidad de suelos. Hay otras especies como el huizache que impiden la erosión de suelos al presentar raíces retenedoras de los mismos.

Otro uso de esta familia es la extracción de colorantes como el Indigo (Azul), del añil y la Hematoxilina del palo de tinte o palo de campeche.

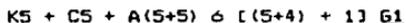
Hay otras que se emplean en la industria textil para la elaboración de pastas, mucilagos y goma arábiga (Acacia). Algunas se usan para la fabricación de fibras o postes para cercas (Gavia). Además hay las que producen carbón (Ebano). Otro de sus usos es como resina utilizada en medicina (Palo de bálsamo), antiséptica, jarabes para la tos, antiparasitarias, elaboración de gomas de mascar y cosmetología.

Es una de las familias más usadas para ornato desde árboles de sombra para ganado y café, hasta flores cortadas.

También las hay que provocan esterilidad en ovejas *Trifolium subterraneus* por producir sustancias estrógenas. Rodríguez y Porras, 1985.

#### 4. Descripción Botánica del frijol

El frijol es una planta C-3, esto es que realiza la fotosíntesis exclusivamente mediante el Ciclo de Calvin; es autógena aunque presenta un cierto porcentaje de polinización cruzada y presenta la siguiente fórmula floral:



La floración y el desarrollo de los frutos es secuenciado, en el frijol en antesis ocurre en forma continua, en un lapso de dos hasta cuatro semanas, según la variedad, el hábito de crecimiento y las condiciones ambientales. Esto también ocurre a nivel de florescencia individual. El hábito de crecimiento se encuentra controlado genéticamente, pero puede ser modificado por el medio. Esto es importante porque está relacionado con características agronómicas y fisiológicas. La producción de botones, flores y vainas jóvenes es mucho mayor que el de vainas normales que llegan finalmente a alcanzar la madurez. Esto se debe a la pérdida de estructuras por abscisión o caída controlada fisiológicamente, pero modulada por el ambiente; además por la ocurrencia de vainas 'vanas' que son retenidas en la planta hasta la madurez de la misma, pero no contienen ninguna semilla normal (Kohashi, 1990).

Presenta una raíz típica o pivotante ramificada en su origen, en la que después se notan nudosidades bacterianas que fijan el Nitrógeno. El tallo puede ser corto y robusto, rastrero y voluble con mayor frecuencia, con pelos cortos y rígidos que favorecen la adhesión a su soporte.

Las hojas exceptuando las dos primeras son compuestas, alternas, pecioladas de color verde claro, con tres folíolos

cordiformes (trifoliadas), y provistas de estípulas y estipulillas persistentes. A veces algunas hojuelas se transforman en zarcillos (Weier, et al. 1980).

Las flores son cigomórficas o actinomórficas, normalmente hermafroditas tienen forma amariposada, presentan un color variable en las distintas especies (rojo, blanco, púrpura, etc.) y se encuentran agrupadas en racimos los cuales salen de las axilas foliares. El cáliz es pequeño y cuenta con 5 sépalos ya sea que esten libres o soldados. La corola dialipétala, con 5 pétalos, un pétalo superior grande llamado estandarte o vexillo, más corto o del mismo largo que las alas; dos pétalos laterales libres o alas, y dos pétalos inferiores, unidos a lo largo de su línea de contacto denominados quilla, la quilla con el extremo agudo y torcido en espiral (Engleman, 1979).

Los estambres son diez, de los cuales nueve están unidos por sus filamentos y uno permanece libre; el ovario es unicarpelar, unilocular y con muchos óvulos. El fruto es una vaina o legumbre (ejote) colgante, recta o arqueada, comprimida gibosa, mucronada que se abre en dos valvas por las suturas ventral y dorsal. Las semillas son de forma variable, generalmente reniformes, y otras veces redondeadas o esféricas. Según éstos se distinguen numerosas variedades de frijol como amarillo, blanco, colorado, bayo gordo, delgado negro, etc., entre los cuales se encuentran incontables híbridos (Ruiz et al., 1950; Sánchez, 1978; Engleman, 1979).

El frijol también es llamado judía, alubia, habichuela, poroto, entre otros nombres comunes dados en otros países. Es una

planta herbácea y anual, cuyas variedades prosperan en todos los climas de preferencia en templados; se da a muy distintas alturas: desde el nivel del mar hasta los 3 000m. (Ruiz, et al. 1950).

### 5. Descripción de la semilla

La semilla es el óvulo maduro y generalmente fertilizado que posee un embrión, nutrientes almacenados, y con el o los tegumentos diferenciados como la cubierta seminal protectora o testa (Corner, 1951; Esau, 1987; López, 1988).

La semilla de frijol es de mediana a grande, más o menos comprimida y con embrión grande, testa dura y seca. La forma de la semilla es principalmente arrifonada, pero en variedades cultivadas aparecen otras formas como la esférica inclusive (Corner, 1951; Engleman, 1979).

La semilla esta formada: por una testa lisa, más gruesa en las formas silvestres que en las cultivadas, que tiende a ser dura y quebradiza, los cotiledones y el eje embrional. que a su vez está constituido por la plúmula cuyo desarrollo dará origen al vástago, y por la radícula de la cual proviene la raíz pivotante. El tamaño de la semilla se puede ver afectado, si se trata de variedades silvestres -pequeñas- y cultivadas -grandes-. (Engleman, 1979).

La semilla a su madurez carece de endospermo (ex-albuminosa). Según CIAT(sin fecha) la testa representa el 9%, los cotiledones el 90% y el resto del embrión 1% en materia seca.

Cuando a la semilla se le proporcionan ciertos factores como son temperatura, humedad y aereación apropiadas ésta germina. Esto

quiere decir que el embrión que se encontraba en reposo, reanuda su crecimiento. Lo primero que sale de la testa es la radícula y posteriormente la plúmula, la cual tiene forma de gancho, hacia el extremo lleva los cotiledones, que emergen del suelo por lo cual es denominada planta epigea.

#### **6. Descripción del Sistema Radical**

La radícula al continuar creciendo se convierte en la raíz primaria, que a su vez, en la parte distal emite raíces secundarias. Las raíces secundarias dan origen a raíces terciarias, éstas a cuaternarias y así sucesivamente. El sistema radical es pivotante (López, 1988; Kohashi, 1990).

En la zona subapical de toda raíz en crecimiento se pueden apreciar los pelos radicales o absorbentes, éstos junto con la región subapical juegan un papel importante en la absorción de agua y nutrientes. El aspecto y tamaño que presente el sistema radical depende de las características del suelo, tales como textura, estructura, porosidad, capacidad de retención de agua, temperatura, contenido de nutrimentos, etc. (CIAT, sin fecha).

#### **7. Descripción del Vástago o porción aérea**

El tallo principal se origina de manera directa del desarrollo de la plúmula y tiene los dos cotiledones en posición opuesta, éstos al paso de unos diez días se desprenden. El sitio en el cual se insertan los cotiledones constituye el primer nudo. En el nudo siguiente, también en posición opuesta se localizan las hojas primarias, que son simples. El resto de las hojas se

encuentran en posición alterna y son compuestas, trifoliadas. En las axilas, tanto de los cotiledones como de las hojas primarias y de las hojas compuestas, se presenta un complejo de yemas axilares. Éstas pueden dar origen a una rama secundaria, o en ciertos nudos, en la época reproductiva a una inflorescencia. La porción del tallo comprendida entre dos nudos se le denomina entrenudo (López, 1988; Kohashi, 1990).

Harper (1977), citado por Kohashi, (1990) apoya la idea de conceptuar al vástago o porción aérea de la planta como un conjunto de módulos que tienen un sistema radical común. Cada unidad modular se encuentra constituida por un entrenudo, la hoja correspondiente en la parte superior y las yemas que ésta sostiene, a esta unidad se le da el nombre de fitómero.

El tallo puede seguir creciendo debido a la actividad de la yema apical. En el caso de las plantas de hábito indeterminado, esta yema puede permanecer en estado vegetativo durante toda la vida de la planta. Estas plantas pueden ser arbustivas como los frijoles o tener una guía más larga y ser de media guía o de guía larga correspondiendo a diversos tipos de frijol, pudiendo ser trepadora la guía o no serlo (Kohashi, 1990).

Por el contrario, existen algunas variedades que durante la época reproductiva la yema apical, tanto del tallo principal como de las ramificaciones, se pueden transformar en yema floral, con ésto tal eje cesa su crecimiento, y la planta entonces presenta un crecimiento determinado.

## 8. Descripción de la flor y el fruto

Las flores se presentan en inflorescencias en racimo, y se desarrollan de la base hacia el ápice de la inflorescencia. Las primeras flores en abrir o presentar la antesis, son las que tienen mayor probabilidad de transformarse en vainas normales. Las formas silvestres de *P. vulgaris* tienden a producir muchos entrenudos por inflorescencia (10 aproximadamente), en cambio las formas cultivadas pueden producir entre 1 y 10, esto indica que el número de entrenudos por inflorescencia se ha reducido con la domesticación de la especie. Sin embargo, con el tamaño de los órganos de la flor ha ocurrido lo contrario.

El fruto es una vaina que consta de semillas y de pericarpio (la vaina sin las semillas). La longitud de las vainas puede variar entre 4 y 20cm. y es común encontrar vainas de variedades silvestres cuya longitud es mayor que la de algunas variedades cultivadas. En algunas poblaciones silvestres puede haber vainas cuya longitud puede variar entre 4 y 7cm. y es común encontrar vainas de variedades silvestres cuya longitud es mayor que la de algunas variedades cultivadas. El ancho y grueso de la vaina puede aumentar al incrementarse la longitud de la misma. La fibrosidad de la vaina se ha reducido con la domesticación de las especies.

Las variedades con vainas fibrosas se utilizan para producir semillas secas, en tanto que las variedades que producen vainas sin fibra se usan para producir ejotes, es decir, frutos para consumirse en estado inmaduro. El color de la vaina en variedades cultivadas es de amarillo o color crema, ya que no se conocen en las formas silvestres. La dehiscencia se ha reducido con la domes-

ticación (Engleman, 1979).

### 9. Importancia del frijol en México

Las leguminosas ocupan el segundo lugar entre las semillas que se usan como alimento en México. Todas las diversas clases de frijol, chícharo y lentejas proporcionan proteínas. Secas contienen del 25% al 40% de proteínas y algunas son ricas en carbohidratos (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de America, 1977). Estos granos se consumen en diversas regiones del país (Norte, Centro, Sur, etc.) pero de acuerdo a registros del último ciclo de producción la región del país que mayor producción tiene es la parte Noreste (SARH, 1990).

El Programa Nacional Alimentario en 1983, señala que aproximadamente el 10% de la cosecha de granos se pierde por prácticas deficientes de almacenamiento, lo cual representa pérdidas de muchos millones de pesos al año.

En México la producción agrícola presenta deficiencias, las principales pérdidas en cuanto a manejo y conservación de granos y semillas ocurren durante el almacenamiento, estas son principalmente cuantitativas y son ocasionadas por factores físicos como: la humedad, temperatura, almacenamiento e industrialización deficientes, así como por factores biológicos que incluyen a los insectos, aves y roedores, que no solamente reducen la cantidad de granos sino además su calidad, ya que los insectos, hongos, aves y roedores contaminan con sus desechos orgánicos los granos y semillas. Otro daño que ocurre después de la cosecha y al cual no se le da la importancia debida, es el fenómeno del

endurecimiento- (Ramírez, 1987).

Uno de los problemas que enfrenta el agricultor desde que siembra hasta que cosecha, es la invasión constante o crecimiento de malezas o malas hierbas en sus cultivos que causan pérdidas debido a competencia, ya sea por los nutrientes, por el agua, por la luz, y por espacios en el suelo debido a la extensión de raíces. Ya que un cultivo que crece con malas hierbas sufre los efectos de pérdida de vigor, alargamiento de los tallos causando acame, aumento del costo de la mano de obra y del equipo, afectan también la calidad de los productos agrícolas, hay una disminución del valor de las cosechas y limitación de la producción de semilla para siembra, además hay un mayor ataque de plagas y enfermedades, por tener hospederas y abrigos de insectos perjudiciales, y micro-organismos causantes de enfermedades como son nemátodos y roedores. Por lo que es muy importante realizar desyerbes a los cultivos ya sea de frijol, maíz, arroz, etc. o de cualquier otro tipo de sembradío (DGSV, 1980).

Los pequeños agricultores tanto de Africa como de América Latina cultivan frijoles en suelos pobres, con bajos niveles de insumos y fuerte presión de enfermedades y sequías por lo que el promedio de rendimiento es bajo. Las enfermedades y las deficiencias nutricionales son una de las principales causas de rendimientos reales tan bajos (CIAT, 1987). En America Central y en el Occidente de America del Sur los frijoles crecen en zonas de montaña, donde predominan los Andosoles (Inceptisoles), en estos suelos la deficiencia de fósforo y exceso de aluminio, y Manganeseo son los principales problemas (Schwartz, et al. 1978).

Los cultivos cíclicos se han clasificado de acuerdo a su época de siembra en cultivos de ciclo Otoño-Invierno (O-I) y cultivos del ciclo Primavera-Verano (P-V). Los primeros son aquellos cuyas siembras se realizan durante el otoño y el invierno y los segundos en la primavera y el verano sin importar su época de cosecha (SARH, 1985).

A continuación se enlistan algunas variedades de frijol que son cultivadas por riego y otras por temporal, además se da la producción esperada para cada estado. Los estados de la República Mexicana que sobrepasan las mil hectáreas cultivadas durante el ciclo Otoño-Invierno 89/90 y Primavera-Verano 90/90 son los siguientes.

Tabla 1 Estados de la República Mexicana que sobrepasan las mil hectáreas cultivadas con frijol.

ESTADOS	AREAS CULTIVADAS (Hectáreas)	PRODUCCION ESPERADA (Toneladas)
Sinaloa	8 050	9 825
Nayarit	4 972	7 458
Durango	2 050	1 025
Tamaulipas	1 400	880

Tabla 2 Estados del país que no llegan a mil hectáreas cultivadas de frijol, se muestran a continuación.

ESTADOS	AREAS CULTIVADAS (Hectáreas)	PRODUCCION ESPERADA (Toneladas)
Chihuahua	900	1 075
Sonora	600	700
Nvo. León	500	500
Guanajuato	250	300
San Luis Potosi	250	500
B. C. S.	200	200
Coahuila	100	-
Hidalgo	50	50
Veracruz	50	33
Zacatecas	50	100
Puebla	40	36
Jalisco	8	4

De las superficies cultivadas en el país 19 470 hectáreas corresponden solamente a espacios cultivados con frijol, esto equivale a un 8.43% del total de hectáreas cultivadas en todo el país, donde se incluyen áreas ocupadas con otros cultivos entre los que destacan garbanzo, cacahuete, ajonjolí, zacates, etc., incluyendo hortalizas.

De la producción esperada del Programa Indicativo de Semillas certificadas para 1990 durante los ciclos Otoño-Invierno 89/90 y Primavera-Verano 90/90, se obtiene un total de 22 786 toneladas de frijol lo cual corresponde a un 3.94% de todos los cultivos producidos en el país, donde se incluyen también cultivos básicos y hortalizas (SARH, 1990).

Si separamos por regiones las superficies cultivadas, se puede ver también la producción obtenida de cada región.

Tabla 3 Superficies cultivadas por frijol en diversas regiones del país.

REGION	SUPERFICIES CULTIVADAS (Hectáreas)	PRODUCCION (Toneladas)
Noroeste	13 822	18 133
Norte	2 950	2 200
Noreste	2 000	1 380
Centro-Norte	300	600
Centro-Pacífico	348	4
Centro	-	386
Centro-Golfo	50	33

No se mencionan las zonas del Pacífico Sur y Peninsular debido a que no existen registros de producción de semillas a nivel comercial, probablemente porque sólo sean para autoconsumo de los agricultores.

En la zona centro no aparecen registros de superficies cultivadas probablemente se deba a que los estados que comprenden esta región no tengan un registro del mismo, o es tan pequeño que no se considera.

#### 10. Variedades de frijol autorizadas para la época de siembra en la República Mexicana.

En México la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos divide a nuestro país en regiones, esto para conocer cuales son las variedades de semillas utilizadas para cultivo y cual es la

producción de semillas en cada estado de la República.

La región Noroeste comprende los estados de Baja California Norte, Baja California Sur, Sinaloa, Nayarit y Sonora. En estos estados se siembran las siguientes variedades de semillas: Contender improved, Tander green, Black valentine, Harvester, Tender crop, Wonder green Gallatin-50, Green crop, Provider, Early gallatin, Cascade, Canario 72, Pinto UI-114 (Pinto Americano), Azufrado pimono, Jamapa, Negro Nayarit 80, Azufrado pimono 78 (Mayocoba), Negro sinaloa, Sataya 425, Canario 101, Canario 78, Azufrado 200, Azufrado regional 87, Azufrado peruano 87, Peruano P-80, Cacahuete largo, Azufrado 100, Canario 107, Kentucky wonder, Olathe y Land mark.

En La región Norte del país, que abarca los estados de Chihuahua, Durango y Coahuila (La laguna) se siembran las siguientes variedades: Ojo de Cabra 73, Canario 107, Mantequilla, Satevo, Canario 107, Bayo rio grande, Pinto nacional, Flor de Mayo, Canario 101, Negro Querétaro 78, Garbancillo supremo, Bayo madero, Bayo Zacatecas, Matamoros 64, Pinto laguna 80, Delicias 71, Early harvester y Contender.

La región Noreste comprende parte del estado de Coahuila y los estados Nuevo León y Tamaulipas, enlistandose a continuación las variedades cultivadas en esta zona: Delicias 71, Pinto UI-114 (Pinto Americano), Flor de Mayo, Mantequilla, Lagunero-87, Early harvester, Contender, Pinto mexicano 80, Jamapa, Pinto norteño, Pinto laguna, Pinto americano 111, Bayocel, Bayo rio grande, Flor de Mayo, Agrarista y Negro Huasteco 81.

La región Centro-Norte del país incluye los estados de Zacatecas, Aguascalientes y San Luis Potosí donde se cultivan las siguientes variedades: Manzano, Negro Zacatecas, Flor de Mayo, Bayo victoria, Bayo río grande, Bayo baranda, Garbancillo supremo, Canario 101, Canario 107, Canario 72, Pastilla, Bayo Zacatecas, Bayo madero, Black valentine, Contender, Flor de Mayo bajo, Negro Huasteco-81 y Jamapa.

La región Centro-Pacífico abarca los estados de Jalisco, Colima y Michoacán, donde se cultivan las siguientes variedades: Bayo Zacatecas, Bayo alteño, Alubia chica, Flor de Mayo, Garbancillo zarco, Cejita, Peregrino, Cacahuate 72, America rayado, Rosa de castilla, Alubia chica, Morado pastilla, Bayo los llanos, Bayo río grande, Bayo alteño, Ojo de Cabra 400, Pinto texano, Bayo 400, Negro Querétaro 78, Flor de Mayo RMC, Sataya 425, Canario 101, Rosita, Apaseo, Bayomex, Bayo barrendero, Jamapa, Azufrado 200, Canario 72, Negro Huasteco 81, Negro Jamapa, Pimono 78 (Mayocoba), Flor de Junio, Azufrado amarillo 33, Black valentine, Contender, Kentucky wonder, Negro Nayarit 80 y Canario 101.

La región Centro-Golfo incluye los estados de Veracruz y Tabasco donde se siembran las variedades: Jamapa, Nacajuda, Negro Huasteco 81, Negro Veracruzano, Tender green y Contender.

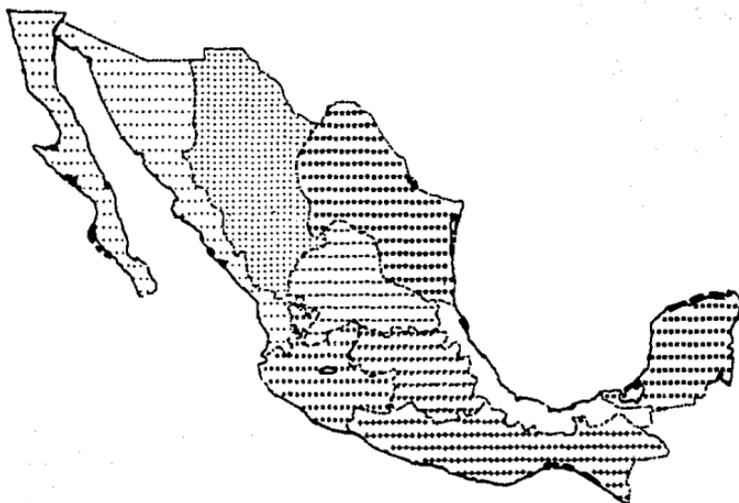
En la región Pacífico-Sur se incluyen los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas; donde las variedades sembradas son: Jamapa, Canario 107, Cacahuate 72, Negro Veracruz, Negro Huasteco 81, Negro Querétaro 78, Flor de Mayo, Negro Puebla, Bayomex, Delicias 71, Yanhuitlan, Jaltepec, Negro Chiapas, Black

valentine y Tandergreen.

Por lo que se refiere a la región Peninsular que incluye los estados de Quintana Roo, Yucatán y Campeche se siembran las siguientes variedades: Jamapa, Negro Huasteco 81, Kentucky wonder, Contender y Tender green.

En la zona Centro del país se abarcan los estados de México Querétaro, Guanajuato, Hidalgo, Tlaxcala, Morelos, Puebla y Distrito Federal; donde se utilizan para cultivo las siguientes variedades: Flor de Mayo RMC, Canario 101, Negro Querétaro 78, Canario 107, Apaseo, Garbancillo supremo, Contender, Tander green, Early harvester, Rodeo, Black valentine, Negro Puebla, Flor de Mayo, Bayomex, Cacahuete 72, Jamapa, Blue lake 274, Bajío, Rosita, Sataya 425, Amarillo 153, Amarillo 154, Negro 150, Bayo mecentral, Negro Huasteco 81, Negro Jamapa, Peruano, Azufrado Peruano 87, Azufrado regional 87 (Mayocoba), Flor de Mayo regional y Blanco Japones. Para entender mejor la distribución de las variedades de frijol en el país, por regiones y las variedades que se cultivan en cada una de ellas, ver el mapa 1.

Mapa 1.



-  Región Noroeste
-  Región Norte
-  Región Noreste
-  Región Centro-Norte
-  Región Centro-Pacífico
-  Región Centro-Golfo
-  Región Pacífico-Sur
-  Región Peninsular
-  Región Centro

## 11. Cambios estructurales durante la imbibición

Los frijoles para ser consumidos deben ser blandos y de sabor agradable; en nuestro país se llevan a cabo una serie de pasos previos a la cocción, donde se incluyen lavado de los granos y remojo. Precisamente es ésta última fase en la que se desea hacer hincapié ya que aquí la semilla sufre cambios que se observan en estudios previos.

La cubierta de la semilla de algunas variedades de frijol poseen buenas propiedades de hidratación, facilitando el reblandecimiento de la semilla durante la imbibición, y es en esta fase de remojo del grano a temperatura ambiente donde se lleva a cabo la hidratación de los gránulos de almidón aumentándose su volumen e iniciándose la gelatinización de los mismos (Mahn, et al 1977; Sefa-Dedeh y Stanley, 1979a; Carabez-Trejo, et al 1989).

Si la cubierta de la semilla es gruesa, la velocidad de absorción de agua es baja, además se ve influenciada por el tamaño del hilio en estados tempranos de remojo (Sefa-Dedeh y Stanley, 1979b.).

La absorción de agua es rápida durante las primeras seis horas y éstas son críticas en los cambios estructurales (reestructuración de las membranas) durante la imbibición. Además, los cambios en la textura durante el remojo son dependientes de los patrones de absorción de agua. Algún cambio ya sea físico, químico o estructural que afecte la absorción de agua puede afectar de modo similar la textura del frijol (Sefa-Dedeh y Stanley, 1979a.; Moscoso, et al. 1984).

Cuando se colocan semillas latentes en agua se ve que todos

los procesos metabólicos son reactivados a excepción de las células en crecimiento y la replicación del DNA. También mencionan que un embrión inactivo puede mantener este estado de desarrollo detenido por meses con los eventos bioquímicos normales, por ejemplo la actividad respiratoria, síntesis de proteínas, síntesis de RNA y metabolismo lipídico en continúa operación (Thimann, 1980).

También se ha mencionado que la toma de agua por los polisacáridos del cotiledón reduce la adhesión intercelular, lo que resulta en una disminución de la firmeza del grano (Rao y Lund 1986). Además la adhesión intercelular resulta de la liberación de la amilasa a través de las paredes celulares promoviendo la unión de las células mediante enlaces de hidrógeno con polisacáridos de la pared celular (Jones, 1977).

## 12. Problemas del endurecimiento

Varios autores coinciden en que el frijol tiende a endurecerse durante el almacenamiento bajo condiciones altas de humedad relativa y temperatura (Gómez, 1982; Moscoso *et al.* 1984; Stanley y Aguilera, 1985; Moreno y Ramírez, 1987 Díaz de León, 1989; Ramírez, 1990.); lo cual se pone de manifiesto al aumentar el tiempo que requiere el grano para su cocción y la mayor energía que necesita para su suavización, lo que provoca que pierda muchas de sus cualidades nutricionales.

En nuestro país se dan de manera natural las condiciones que provocan el fenómeno del endurecimiento, lo cual agrava la escasez del frijol.

Respecto a problemas del endurecimiento existen diversos estudios entre los cuales podemos enumerar: de tipo Cualitativos, Estructurales y Bioquímicos.

### **12.1 Estudios cualitativos**

Entre los pocos estudios cualitativos se encuentra el de Sefa-Dedeş y Stanley (1979b.) donde mencionan que variedades de Cowpea con cubiertas de las semillas lisas hierven satisfactoriamente y tienen una proporción inicial de absorción de agua baja, pero que las variedades que muestran una velocidad de absorción de agua relativamente alta hierven mejor si antes son remojadas.

Además que la absorción de agua de las variedades de Cowpea fueron influenciadas por las estructuras externas tales como el grosor de la cubierta y el tamaño del hilio, en estados tempranos de remojo.

### **12.2 Estudios estructurales**

Entre los estudios a nivel de estructura existen algunos trabajos que se llevaron a cabo bajo diferentes Sistemas ópticos como son los de Microscopía Fotónica, Microscopía Electrónica de Barrido y por Microscopía Electrónica de Transmisión.

## A. Trabajos con Microscopía Fotónica

Entre los estudios de Microscopía Fotónica se encuentra el de Hahn, et al., en 1977 donde se observa que la máxima expansión del almidón ocurre en el punto de ebullición (100°C) durante la cocción y que éste estado de expansión es dependiente solamente de la temperatura del medio e independiente del tiempo durante el cual las células son mantenidas a una temperatura dada. Además se ha visto que la deformación de los gránulos de almidón se inicia en la porción central y se asocia con la disminución de la birrefringencia de los gránulos cuando se observan con Microscopía de Polarización.

Por Microscopía de Luz se ha visto que el gran cambio estructural durante la cocción es la separación de las células del cotiledón del frijol. Tal separación se da porque la lámina media se solubiliza lo que provoca una pérdida en la rigidez de tal estructura. Pero esto no sucede durante la cocción de un frijol duro donde las células del cotiledón no se separan y permanecen unidas por la lámina media (Sefa-Dedeh y Stanley, 1979a.; Jones y Boulter, 1983; Díaz de León, 1989).

Hincks and Stanley, (1987) probaron la existencia de lignificación en frijoles negros durante el almacenamiento e indican que material fijado en KMnO<sub>4</sub> tenía fuerte depósito de Dióxido de Manganeso en las esquinas de las células, paredes secundarias y lámina media de frijoles duros, un patrón visto durante la lignificación de los tejidos de la planta. Estos resultados apoyan un posible mecanismo alternativo para el desarrollo del fenómeno del endurecimiento del frijol.

Através de Microscopía de Luz Carabez-Trejo et al. (1989) observaron gránulos de almidón de frijoles almacenados por 120 días bajo alta temperatura (33°C) y alta humedad (76°C), los cuales tienen una superficie plana y una apariencia redonda; este almidón parece estar rodeado por muchos cuerpos proteícos no muy bien definidos.

También observan las células cotiledonarias de semillas frescas no cocidas y no deterioradas, las cuales presentan una apariencia regular en los frijoles FM-240 e irregular en los frijoles FM-297. La lámina media y las estructuras de plasmodesmos fueron claramente definidas en áreas donde se unen las células.

Material de semillas almacenadas duras y crudas muestran que la dureza incrementa la talla celular de los cotiledones y parece que la estructura de ejemplares FM-297 se ve más afectada que la de FM-240. La pared celular del frijol FM-297 fue irregular, los plasmodesmos fueron muy prominentes y los cuerpos proteícos no fueron bien definidos.

La lámina media es fija y se encuentra presente en las dos diferentes células cotiledonarias. La pared de las células es ancha y más regular en frijol FM-240 que en FM-297. Los gránulos de almidón parecen más amorfos en el primero que en el segundo.

Las semillas frescas y cocidas por 60min vistas a través de Microscopía de Luz previa imbibición (durante 12 horas) producen una separación celular de las células cotiledonarias remarcable en las dos variedades comparada con los frijoles frescos y crudos. Durante la cocción los gránulos de almidón fueron claramente afectadas sugiriendo un estado de gelatinización. Los cuerpos

proteicos fueron también colapsados y modificados en una masa amorfa.

Además mencionan que los ejemplares duros por imbibición en acetatos, mostraron niveles de cocción muy cercanos a los endurecidos por almacenamiento (a temperatura de 33°C y humedad de 76%); De modo interesante, en un tiempo corto de imbibición los procesos generados en semillas difíciles de cocer tanto los endurecidos por imbibición en acetatos como los almacenados presentan condiciones comparables.

Las células cotiledonarias de ejemplares duros por procedimientos químicos, imbibidos en agua y cocidos, producen algunos cambios sobresalientes como son: la talla celular de los 2 cultivares fue pequeña en comparación al de las semillas duras y crudas. Todas las células tienen una apariencia más amorfa y gelatinizada.

#### B. Trabajos con Microscopía Electrónica de Barrido

La Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) se utilizó para estudiar cambios en la estructura, durante los procesos de cocción y resulta que el mayor efecto que se observó fue un resquebrajamiento de la lámina media, donde las paredes celulares permanecieron intactas. Tal ruptura puede contribuir al reblandecimiento de Cowpea y posiblemente al de otras leguminosas (Sefa-Dedeh et al., 1978).

En otro trabajo el mismo autor comparó y examinó 8 variedades de Cowpea, y observó que los cotiledones poseen una estructura

celular altamente organizada. También encontró que en todas las variedades las células parenquimatosas fueron de forma similar (60-120um) conteniendo gránulos de almidón (18-27um) y cuerpos proteicos (2-6um). Sin embargo encontraron diferencias en las propiedades de hidratación y ebullición, asociadas con las células en empalizada de la cubierta seminal (Sefa-Dedeh y Stanley 1979b.).

Con el propósito de estudiar cambios estructurales en frijoles difíciles de cocer Carabez-Trejo et al., 1989 almacenan frijoles 120 días bajo alta temperatura 33°C y humedad relativa de 76%. Mediante el Microscopio Electrónico de Barrido, encontraron que hay una separación celular evidente y que el tiempo de almacenamiento disminuye el tiempo de cocción en las condiciones antes mencionadas.

También muestran que la condición de granos difíciles de cocer produce un material semejante a esponjas, en contraposición a lo observado para semillas frescas, las cuales muestran granos de almidón planos, embebidos en un material semejante a membrana y donde uno de los ejemplares exhibe un material semejante a una malla.

Otra observación muestra que los gránulos de almidón fueron embebidos en estructuras semejantes a poros, los cuales fueron más compactos en el cotiledón de la variedad FM-297 que en la FM-240. Además que la superficie de los gránulos de almidón no fue plana como en Micrografías previas.

### C. Trabajos con Microscopía Electrónica de Transmisión

A través de la Microscopía Electrónica de Transmisión se observó material de la pared celular de los frijoles duros y se menciona que ésta, tiene una apariencia lamelada, por lo que se sugiere que esto es un resultado de la depositación de celulosa, como un proceso que ocurre antes de la lignificación. Además indican que el material fijado en Permanganato de Potasio tenía fuerte depositación de dióxido de Manganeso en las esquinas de las células, paredes secundarias y la lámina media de frijoles duros, un patrón visto durante la lignificación de los tejidos de la planta (Hincks y Stanley 1987).

### 12.3 Estudios bioquímicos

Holberg y Stanley (1987) hicieron una separación de proteínas de frijol común almacenado y encontraron que en la fracción 1 se localiza la phaseolina, principal proteína presente y ésta decrece significativamente durante el almacenamiento en temperaturas y humedades altas, lo mismo que en humedades y temperaturas bajas. Además obtuvieron fitohesaglutinina en otra extracción y mencionan que la proporción de ésta fue mas alta que la del 10% registrada por Baumgarther y Chrispeels en 1977. También encontraron 4.9% globulina (inhibidores de amilasa) y subunidades de lectina y phaseolina, que representan cerca del 10% del extracto total de proteínas. En otra fracción se encontraron albuminas tales como enzimas e inhibidores de tripsina.

Gómez (1982) observó que el contenido de taninos disminuye con el tiempo de almacenamiento y que este fenómeno se hace mas

evidente en frijoles almacenados a temperaturas mas altas, lo cual sugiere la posibilidad de que los taninos pudiesen migrar al interior del grano, oxidarse y así intervenir en el proceso del endurecimiento.

También observó un proceso que ocurre de modo simultáneo al aumentar la temperatura de almacenamiento, esto es que al disminuir la cantidad de taninos aumenta la actividad de la polifenol oxidasa, lo que sugiere que el contenido de taninos fue producido por oxidación enzimática de los misaos, lo que apoya la hipótesis de que el endurecimiento del grano puede deberse a una oxidación de polifenoles como sucede en otros vegetales.

Moscoso, et al 1984 mencionan que posiblemente la menor cocción de frijoles maduros almacenados bajo altas temperaturas y condiciones de humedad alta se deba a un decremento en ácido fítico, fósforos y alteraciones en la relación de cationes monovalentes o divalentes en el tejido; y ya que el alto contenido de ácido fítico en frijoles favorece una tasa de ablandamiento rápido y una disolución en la forma de las sustancias pécticas, además muestran un cambio el cual no es significativamente en el contenido de ácido fítico.

Hincks and Stanley (1987) mencionan que la síntesis de polifenoles podría ser dañada por pequeños polipéptidos y aminoácidos aromáticos libres que son el resultado de grandes proteínas hidrolizadas. Estos compuestos presumiblemente migran hacia la lámina media después de un período de almacenamiento de alta humedad y temperatura, las cuales son lignificados quizá por la cocción de enzimas movilizadas, estas reacciones se sabe que

están catalizadas por peroxidases detectadas en extractos de semillas.

Díaz de León (1989) encontró que la desmetilación de la pectina no contribuye de manera importante en el desarrollo del endurecimiento del grano a los niveles alcanzados hasta 33 días de almacenamiento a una temperatura de 41°C y una humedad relativa del 75%. También observó que tanto los niveles iniciales de metilación de la pectina, como el grado de desmetilación que sufre cuando el grano es almacenado guarda una relación inversa con la susceptibilidad al endurecimiento que presenta el grano. Además que no se conocen los procesos físicoquímicos involucrados en el fenómeno del endurecimiento.

Hahn *et al* (1977) observaron en granos de frijol que la temperatura de gelatinización inicial de los gránulos de almidón fue de 5-6°C la cual se detectó positivamente en la porción central de los mismos. Además que existe una temperatura para la gelatinización, deformación y dispersión de los gránulos de almidón y que es de 79-85°C en agua salada la cual fue más alta que en agua pura (71-79°C).

Los gránulos de almidón se gelatinizan más difícilmente cuando los frijoles se remojan en soluciones salinas requiriendo mayor temperatura al hervirlos y también al gelatinizarlos extracelularmente. Mencionan también que se ha sugerido que las altas temperaturas de gelatinización intracelular pueden deberse a la interacción del almidón con otros componentes celulares tales como proteínas (Dohile, 1971), á. fítico y otras sales inorgánicas (Osman, 1965).

## OBJETIVO

Conocer la estructura e histoquímica de la semilla madura de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* al 50% de imbibición en agua.

## MATERIAL Y METODO

Se utilizaron dos variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Michigan 800 y Ojo de Cabra, proporcionados por la Unidad de Investigación en granos y semillas UNAM-INIFAP, Aguascalientes.

Se realizó la observación de semillas de cada una de las variedades a través del Microscopio Estereoscópico para conocer las diferencias morfológicas externas aparentes de las mismas. Además se midieron las principales dimensiones de la semilla, como son largo, ancho, y profundidad, siguiendo las referencias dadas por Sefa-Dedeh y Stanley 1979b. así mismo se hicieron mediciones del hilo (largo y ancho).

También se realizó la observación del micrópilo a través del Microscopio Estereoscópico para ver en que porcentaje de semillas se encuentra abierto y en cual obliterado.

### 1. Determinación del porcentaje de Imbibición

Las semillas utilizadas para este trabajo se mantuvieron almacenadas a 4°C durante 1 año. A cada una de las variedades se les determinó el porcentaje de imbibición siguiendo las referencias dadas por Sefa-Dedeh *et al.* 1978.

Se tomaron 100 gr. de frijol seco de cada variedad, se enjuagaron con agua corriente y se mantuvieron durante dos horas en remojo, se sacaron y escurrieron para tomar el peso total del frijol.

El mismo procedimiento se continuó realizando cada dos horas hasta que el peso ya no varió (36 horas), es decir, obtener el

cien por ciento de imbibición para cada una de las variedades por separado. Apartir del registro anterior se determinó el tiempo en que alcanzaron un 50% de imbibición.

## 2. Procesamiento de las muestras para Microscopía Óptica

Los frijoles embebidos al 50% se cortaron para obtener pequeñas fracciones de cotiledón y testa, mientras que el hilio y el embrión se mantuvieron enteros. Posteriormente éste material se fijó en F.A.A. (formaldehído 100ml, ácido acético glacial 50ml, alcohol al 96% 500ml y agua destilada 350ml.) durante 1 mes y se sometieron a un lavado de agua corriente durante 3 horas, para eliminar el exceso de fijador.

Se tomó parte del material antes fijado (cotiledón, testa, hilio y embrión) de las semillas de ambas variedades previamente lavadas, se deshidrataron con alcoholes graduales (30%, 50%, 70% 85%, 96%) pasando por alcohol absoluto, dos horas en cada cambio, llegando a Xilol-Paraplast 1:1 durante 24 horas, ésto para permitir una mejor impregnación del paraplast en el tejido del frijol. Después se realizó la inclusión en paraplast (56°C) de acuerdo con la Técnica de Johansen (1940), obteniendo cortes de 9µ de grosor en el micrótopo de rotación (American Optical 820), estos cortes se procesaron para evidenciar la estructura celular y para realizar las respectivas pruebas histoquímicas.

## 2.1 Pruebas histoquímicas

Para realizar las pruebas histoquímicas se utilizaron cortes en fresco y cortes en parafina y se sometieron a diferentes tinciones específicas:

A los cortes en parafina se les aplicó Acido Peryodico-Reactivo de Schiff (PAS) para detectar polisacáridos insolubles; Azul Mercúrico de Bromofenol para evidenciar proteínas; Rojo "O" de aceite para cutículas y grasas y Permanganato de Potasio (KMnO<sub>4</sub> al 2%) para taninos.

En los cortes frescos se aplicó lugol para detectar almidón y Alyzarina roja para calcio.

## 3. Procesamiento de las muestras para Microscopía Electrónica de Barrido

Se utilizó el Microscopio Electrónico de Barrido JOEL JSM-35 para estudiar con detalle la estructura de ambas variedades, y ver si existían cambios en la microestructura durante la imbibición a un 50%.

Parte de las muestras (cotiledón, testa, hilio y micrópilo) previo lavado, también se deshidrataron con alcoholes graduales (30%, 50%, 70%, 85%, 96%) hasta llegar a alcohol absoluto durante dos horas en cada uno, después se hizo un cambio rápido de acetona absoluta y posteriormente se pasaron por un desecador de punto crítico (TECNIIS), se aplicó un baño de oro con ayuda de una evaporadora y se observaron al Microscopio Electrónico de Barrido Joel (JSM-35) para proceder a la toma de Micrografías a una aceleración de voltaje de 25 kv.

#### 4. Procesamiento para la Extracción del almidón

Por otra parte varias semillas se fijaron en F.A.A. durante 1 semana y posteriormente se pasaron en alcohol al 70% para realizar la extracción del almidón de cada una de las variedades. Para cada variedad se realizó el siguiente procedimiento (Díaz-Pontones, Comunicación Personal).

Se pesaron tres frijoles en la balanza analítica, removiendo la testa del grano antes de pesarla. A partir de lo anterior las muestras se mantuvieron en hielo para homogeneizar el embrión y los cotiledones con ayuda de un homogeneizador (Thomas Scientific USA) y se agregaron 3ml de azida de sodio con el propósito de fraccionar bien los cotiledones. Después se vació en un vaso de precipitados y se agitó con un agitador magnético (Thermolyne type 1000 stir plate) durante 1 hora, y se agregó lugol (150 ul) para evidenciar el almidón.

Se filtró la suspensión anterior y se lavó con azida de sodio de donde se obtuvieron dos fracciones. Una parte que si pasa através de la malla (con una abertura de 100u), que denominamos almidón acuoso y otra que no pasa, se llamó almidón grueso.

La fracción denominada almidón acuoso que corresponde a la parte filtrada a través de la malla se lavó con azida de sodio y se dejó sedimentar, después se desecho el sobrenadante posteriormente se agregaron 5ml. (aproximadamente) de alcohol 70 durante 24 horas a temperatura ambiente. Luego se agitó y centrifugó (en una centrifuga Solvat) a 2 500 r.p.m. durante 10 minutos. Una vez centrifugado se desecho el sobrenadante, después se agregó alcohol absoluto al botón de almidón durante 20 minutos

y se cubrió con parafilm para evitar la evaporación. Se volvió a homogeneizar la suspensión con un agitador y se centrifugó nuevamente a 2 500rpm durante 10 minutos. Nuevamente se desechó el sobrenadante, se agregaron 5ml de hexano (2 cambios de 24 horas cada uno) después se volvió a homogeneizar y centrifugar a 2500 rpm (10 minutos), para posteriormente extraer y desechar el sobrenadante. Ya teniendo el botón sin hexano se agregó alcohol 80% y se vació la suspensión en una cajita de Petri dejándose secar a temperatura ambiente durante 1 día como mínimo.

Por otro lado tenemos el almidón grueso, el cual se sometió al mismo procedimiento que el almidón acuoso (para entender mejor este procedimiento ver el diagrama No.4).

El almidón en polvo se montó en un portaobjetos con Bálsamo de Canadá y se observó en el Microscopio a través del Sistema de Luz Polarizada y se tomaron las respectivas Fotografías.

## RESULTADOS

### 1. Porcentaje de imbibición

De acuerdo al registro obtenido en la determinación del porcentaje de imbibición, se vió que el 50% para la variedad Michigan 800 fue de 1:50 hrs. y para la variedad Ojo de Cabra fue de 7:00 hrs. Este resultado nos muestra una diferencia de 5:10 horas en Ojo de Cabra para alcanzar el 50% de imbibición respecto a la variedad Michigan. (Ver gráficas 1 y 2).

### 2. Morfología Externa

Los granos del frijol en estado seco presentan una cubierta lisa la cual tiende a ser dura y quebradiza. La región hilar más o menos alargada, se hace evidente en la superficie de las semillas cerca del ápice de la radícula y su tamaño es proporcional al tamaño del grano; además en un extremo del hilio se encuentra el micrópilo y en el extremo contrario una saliente en forma de dos gotas contiguas denominada lentilla (Láminas I y IV).

Las semillas de la variedad Michigan (tanto secas como remojadas) tienen forma casi esférica son de color blanco (ver Lámina I) y son consideradas como frijol bayo (Dra. Bernal-Lugo, Comunicación Personal). El grano en estado seco tienen una longitud promedio de 8.5mm de largo, 6.0mm de ancho y 4.7mm de profundidad. El tamaño promedio del hilio es de 0.19mm de largo y 0.11mm de ancho. El micrópilo se encuentra abierto en el 82% de las semillas y obliterado en el 18% restante.

Las semillas de la variedad Ojo de Cabra (secas como

remoçadas) tienen forma arriñonada (ver Lámina I) y son consideradas como frijol pinto (Dra. Bernal-Lugo, Comunicación personal) con fondo beige y manchas café; su longitud promedio del grano seco fue de 11.9mm de largo, 0.69mm de ancho y 4.9mm de profundidad. El hilio tiene un tamaño promedio de 0.26mm de largo y 0.12mm de ancho. El micrópilo se encuentra abierto en el 2% de las semillas y obliterado en el 98% de las mismas.

El embrión en ambas variedades llena completamente el interior del grano y está constituido por dos cotiledones grandes y gruesos, con el eje embrionario doblado hacia atrás contra ellos. La zona del epicotilo (plumula) yace entre los cotiledones.

### 3. Microscopía de Campo claro

Para analizar la morfología interna del tejido de frijol se utilizó la Microscopía de Campo claro y de esta manera se observaron los estratos celulares que conforman el mismo y las células de cada estructura en el frijol.

#### 3.1 Anatomía

Los cortes obtenidos de cada una de las muestras se procesaron parte para evidenciar estructuras celulares con la doble tinción Safranina-Verde rápido propuesta por Jensen, 1962; y la otra parte se sometió a pruebas histoquímicas con el propósito de determinar el contenido celular.

En los cortes transversales del cotiledón de ambas variedades se observó claramente una cutícula que lo rodea, después sigue una capa uniestratificada, de células epidérmicas pequeñas, alrededor

de todo el tejido, adyacente a ésta se encuentra el parénquima el cual está formado por células isodiamétricas de gran tamaño, con un citoplasma muy activo (granuloso), dentro de las mismas se encuentran gránulos de almidón, además se observan pequeños triángulos entre las células que corresponden a espacios de aire. El tamaño de las células de la variedad Michigan es más pequeño con respecto al tamaño de las células en la variedad Ojo de Cabra (Lámina II).

Se evidencian también grupos celulares que corresponden a grandes cantidades de haces vasculares que atraviesan por entre las células parenquimáticas (Lámina II, figura 1).

El almidón de ambas variedades posee diversas formas y van desde gránulos redondeados o esféricos hasta alargados, los cuales se encuentran sumergidos en una matriz proteica con un centro hialino y a veces en forma como de erizo. Estos últimos se encontraron en mayor cantidad en la variedad Michigan 800, que en la variedad Ojo de Cabra.

Los granos de almidón de la variedad Ojo de Cabra se ven más íntegros, con respecto a los de la variedad Michigan 800 en la que se observan más difusos, aunque el contenido de humedad es el mismo en ambos granos (50%). (Lámina II, figura 1 y 2).

En la variedad Michigan 800, el citoplasma se ve más granuloso que en la variedad Ojo de Cabra donde aparece en forma de malla o red y con ciertas inclusiones densas entremezcladas.

Otra cosa que se observa en ambas variedades es que al ser embebidas la pared celular parece tener ciertas alteraciones en la membrana plasmática, que no se observan en frijoles de las mismas

variedades en estado seco (Biol. Alvarado Franco, Comunicación Personal) lo cual puede atribuirse a la hidratación de las mismas.

En la variedad Ojo de Cabra estas ondulaciones son mas regulares o geométricas, ésto podría deberse a que la entrada de agua ocurre lentamente. En el caso de la variedad Michigan estas ondulaciones también se presentan pero no son tan definidas como en el caso anterior, ésto hace suponer que se debe a que la entrada de agua es más rápida por lo que hay un cambio brusco y posiblemente una destrucción celular. Cabe mencionar que estas ondulaciones coinciden con el punto de unión entre una célula y otra, por lo que el número de éstas varía, lo que podría indicar que es la zona de mayor presión.

La capa exterior de la semilla, que envuelve al embrión se denomina cubierta seminal, la cual a través de cortes se le contaron tres estratos celulares que conforman este tejido. La capa mas externa está formada por un estrato de células columnares epidérmicas denominadas esclerénquima en empalizada que estan rodeadas por una cutícula.

Un estrato intermedio, entre las células en empalizada y las células del mesófilo, es la capa media, la cual se encuentra constituida por una capa uniestratificada de células hipodérmicas o células de la epidermis interna llamadas reloj de arena, las cuales presentan una ligera constricción en la parte media, con los extremos expandidos; en la variedad Ojo de Cabra se ve mejor esta forma; sin embargo en la variedad Michigan 800 no es tan definida, además de presentar cristales entre estas células. El estrato más interno es una capa de células de forma isodiamétrica

denominada mesófilo la cual se encuentra conformada por restos de paredes celulares del parénquima, adyacente a esta se encuentra otra cutícula (Lámina II, figuras 3 y 4).

Cabe señalar que la capa de esclerénquima en empalizada de la cubierta seminal, de la variedad Ojo de Cabra, presenta un lumen celular en forma piramidal cuyo eje mayor es perpendicular a la superficie y su base se encuentra en la parte más interna de este estrato: Este lumen no se observó claramente en la variedad Michigan 800.

En el interior de las células del mesófilo de la variedad Ojo de Cabra se presentan acumulaciones que son de color ámbar al natural pero al teñirse con Safranina-verde rápido tienen reacción positiva de color rojo, lo mismo sucede con el contenido de las células del esclerénquima en empalizada antes mencionados y la variedad Michigan carece de estos depósitos tanto en el mesófilo como en el Esclerénquima.

En las dos variedades estudiadas se observó que cerca de la región hilar existe una capa de células alargadas que se corresponde con la capa de esclerénquima en empalizada del resto de la testa, y adyacente se encuentran las células de reloj de arena que al acercarse al hilio desaparecen.

En la parte más externa de la región hilar, de ambas variedades, se encuentra una capa pluriestratificada de células alargadas llamadas del corcho o suberosas, continúa una doble capa de esclerénquima en empalizada con sus células alargadas cuyo eje mayor es perpendicular a la superficie. De estas dos capas la interna se continúa con la empalizada del resto de la testa. Sin

embargo la fuerte reacción del contenido de estas células. no se observa en la región hilar. Adyacente a ésta sigue en ambas variedades una capa pluriestratificada de células parenquimáticas con células amorfas, y que en la variedad Ojo de Cabra presentan inclusiones en su interior, y en los estratos ya no se distinguen (Lámina II, figuras 5 y 6).

Siguiendo la doble capa en empalizada hasta donde termina, podemos observar la lente o lentilla en ambas variedades, la cual tiene una sola capa de esclerénquima en empalizada, con el lumen celular de forma piramidal (sólo en la variedad Ojo de Cabra, Michigan no lo presenta), adyacente a la capa anterior se puede observar una capa pluriestratificada de células con sus paredes muy engrosadas, cuyo interior se encuentra ocupado por acumulaciones que se tiñen de rojo con la doble tinción Safranina-verde rápido (Lámina III).

### 3.2 Pruebas histoquímicas

La prueba de Alyzarina aplicada en cortes frescos de hilio da positivo en las paredes del parénquima subhilar, también en las paredes tangenciales del esclerénquima más externo de la doble capa de empalizada, en ambas variedades. Además se observa la reacción positiva en el citoplasma de las células epidérmicas del cotiledón. La testa y el embrión no tienen ningún tipo de reacción.

Con la prueba de Ac. Peryodico-Reactivo de Shiff (Johansen, 1940) los cortes de testa reaccionan de modo positivo en las paredes tangenciales y radiales del esclerénquima en empalizada

así como los restos de paredes celulares del parénquima. Además se detecto reacción positiva en las células 'reloj de arena' de ambas variedades. En la región hilar la reacción se da en las paredes periclinales y anticlinales del esclerénquima externo de la doble capa de empalizada y los restos de paredes celulares del parénquima así como en la unión de los dos esclerénquimas en empalizada. En el embrión no hay reacción.

Con la prueba de Azul Mercúrico de Bromofenol (Johansen, 1940) podemos evidenciar proteínas, ésto se pudo ver claramente en el citoplasma de las células epidérmicas así como en las células cotiledonarias en ambas variedades; también se hizo evidente en todas las células embrionarias tanto en la región del epicótilo como en la zona radicular. En la testa y el hilio no hubo reacción.

El Permanganato de Potasio se usa para detectar taninos (Johansen, 1940) en hilio se da la reacción entre la doble capa de empalizada en ambas variedades. En la región de la lentilla se da en las acumulaciones que están en el interior de las células de la variedad Ojo de Cabra.

Por lo que respecta a la testa la reacción se da en el lumen celular del esclerénquima, así como en las acumulaciones del mesófilo de la variedad Ojo de Cabra, pero la variedad Michigan al carecer de estas estructuras no presentan reacción.

Con la prueba Rojo 'O' de aceite para lípidos en ambas variedades, se da la reacción positiva en la cutícula que rodea las células cotiledonarias, así como la cutícula que separa la testa del embrión.

#### 4. Microscopía Óptica con Sistema de Polarización

A través del sistema de luz polarizada se observaron los gránulos de almidón de las dos variedades, donde se hicieron evidentes las cruces de malta en la parte central del gránulo por la birrefringencia del sistema de polarización; también se lograron ver gránulos de almidón de diversas formas y tamaños, pero no se logró ver diferencias en el tipo de almidón acuoso y el almidón grueso.

#### 5. Microscopía Electrónica de Barrido

La variedad Michigan presenta una cubierta lisa, una región hilar más o menos alargada y ancha con pequeños orificios. En la región de los cotiledones se observan gránulos de almidón dentro de las células del parénquima, aunque también se ven paredes celulares vacías donde ya no se encuentra ningún contenido celular, probablemente esto se debió a manipulación de la muestra (Lámina V).

Además se observa el micrópilo el cual presenta en forma de 'V' y se encuentra abierto. Se observó la lentilla, que se encuentra del lado contrario al micrópilo y al hilo, y tiene forma de corazón. Del lado contrario a la lentilla la testa se rompió y probablemente por el hinchamiento de los cotiledones embebidos (Lámina IV, figura 1).

La variedad Ojo de Cabra tiene también una cubierta lisa y el micrópilo en forma de 'Y' el cual se encuentra obliterado. El hilo es de forma alargada con orificios más grandes que los observados en la variedad Michigan.

Por cortes manuales y transversales de la región hilar se lograron ver células alargadas que podrían corresponder a la doble capa en empalizada y una parte central donde se ven células desde redondeadas hasta hexagonales, las cuales presentan orificios, que corresponderían al mesófilo.

Además se observa una fractura a lo largo de la lentilla en la variedad Ojo de Cabra (Lámina I, figura 2). En cotiledón se ven paredes celulares vacías y algunas células tienen gránulos de almidón en su interior (Lámina V, figuras 1 y 2).

#### **6. Extracción del almidón**

Los resultados obtenidos de la extracción del almidón son los siguientes. En ambas variedades se extrajeron dos fracciones de almidón, uno denominado almidón acuoso y otro almidón grumoso, este último no pasó a través de una malla de 100u por más que se homogeneizó.

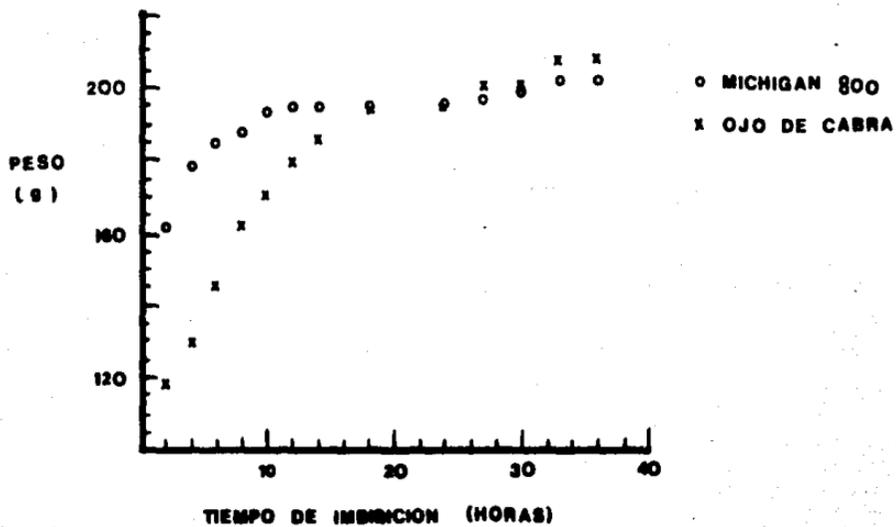
La forma de los gránulos de almidón varía desde redondos hasta ovalados. A través de las observaciones cualitativas se pudo notar que los gránulos del almidón acuoso son más numerosos y pequeños en comparación con los gránulos del almidón grumoso, esto en ambas variedades. Además se hacen evidentes acúmulos de gránulos en los dos tipos de almidón, así como gránulos de almidón dispersos.

En la variedad Ojo de Cabra se encontró que el 91.78% corresponde a el almidón grumoso y el 8.22% es de almidón acuoso.

La variedad Michigan 800 tiene un 19.47% de almidón acuoso y el 81.53% restante que corresponde al almidón grumoso.

GRAFICA DE VELOCIDAD DE ABSORCION DE AGUA EN DOS VARIIDADES

DE Phaseolus vulgaris L.

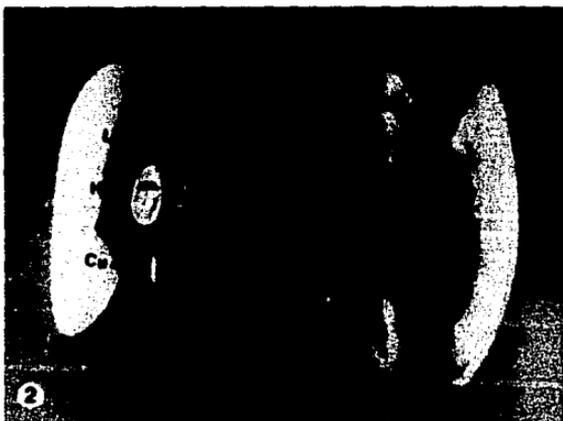
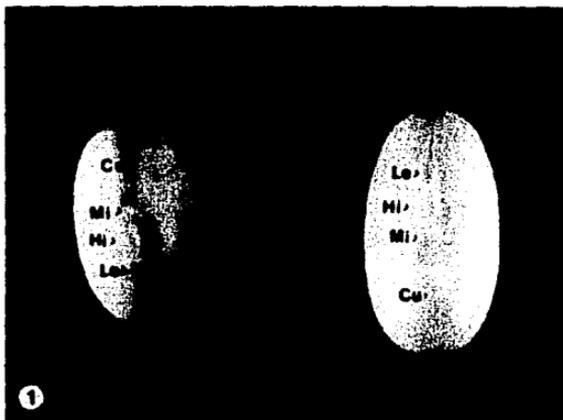


## LAMINA I

Fig. 1 Morfología externa de semilla madura de *Phaseolus vulgaris* var. Michigan 800. En el lado izquierdo se muestra la semilla seca y al lado derecho la semilla embebida al 50%. Se evidencia la región hilar (Hi), el micrópilo (Mi), la lentilla (Le) y la cubierta seminal lisa (Cu) de color blanco. Además se observa en la semilla embebida una fractura al lado opuesto de la lentilla. 5x

Fig. 2 Morfología externa de la semilla madura de *Phaseolus vulgaris* var. Ojo de Cabra seca y embebida al 50%. Se observa la región hilar (Hi), la lentilla (Le) y la Cubierta seminal lisa (Cu) con manchas de color café. No se observa el micrópilo, pero se encuentra en la semilla. 5x

# LAMINA I



## LAMINA II

Fig. 1. Corte transversal de Cotiledón var. Michigan 800. Se observan granulos de almidón (Al) rodeados de una matriz proteica (Mp), lámina media (Lm) y Paredes Celulares (Pc). Contraste de Fases 40x.

Fig. 2. Corte transversal de Cotiledón var. Ojo de Cabra. Se nota el parénquima dentro se se evidencian granulos de almidón (Al) rodeados de una matriz proteica (Mp), lámina media (Lm) y Paredes celulares (Pc). Contraste de Fases 40x.

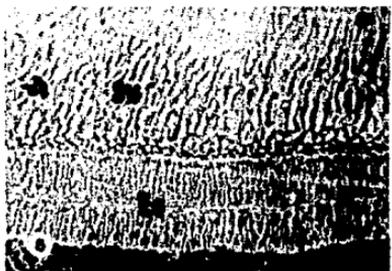
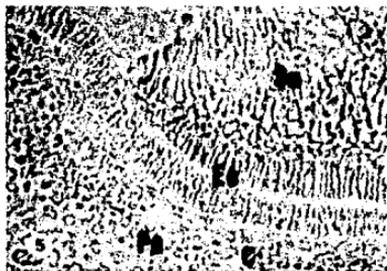
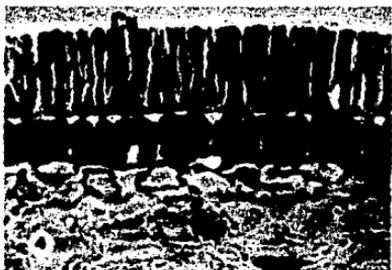
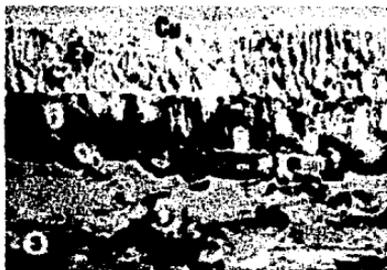
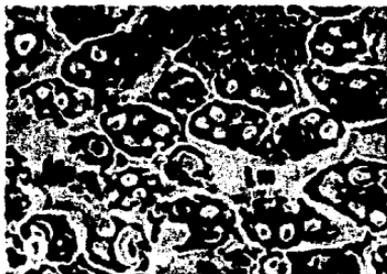
Fig. 3. Corte transversal de Cubierta seminal var. Michigan 800. Formada por 3 estratos. Las células más externas llamadas Esclerenquima en empalizada (Ee) en su parte externa delimitada por una cutícula (Cu), adyacente una capa de células denominadas reloj de arena (Cr) en cuyo interior se notan cristales (C) y la capa más interna es el mesófilo. Contraste de Fases 40x.

Fig. 4. Corte transversal de Cubierta seminal var. Ojo de Cabra. Se observan 3 capas. La más externa es una capa de Esclerenquima en empalizada (Ee) con un lúmen muy amplio en la base, esta capa delimitada por una Cutícula (Cu), sigue una capa de células columnares llamadas reloj de arena (Cr) y el mesófilo. Contraste de Fases 40x.

Foto 5. Corte longitudinal de hilio var. Michigan 800. Se evidencian 3 estratos. El más externo es una capa de células pluriestratificadas del suber (Su), continúa una capa doble de Esclerenquima en empalizada (Ee) y en la parte más interna se encuentra el parénquima que presenta cristales de composición química no determinada entre sus células.

Foto 6. Corte longitudinal de hilio var. Ojo de Cabra. Se evidencian 3 estratos. El más externo es una capa de células pluriestratificadas del suber (Su), continúa una capa doble de Esclerenquima en empalizada (Ee) y en la parte más interna se encuentra el parénquima que presenta inclusiones (que reaccionan positivamente con la prueba de taninos) en su interior.

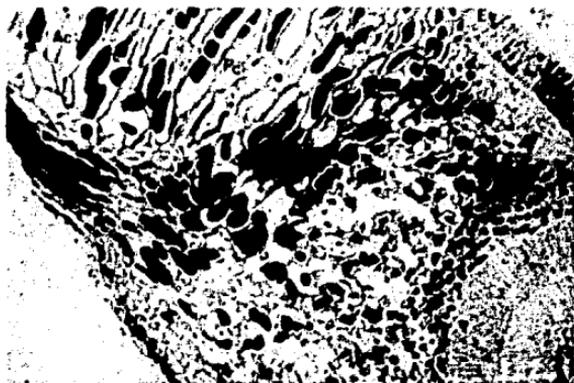
LAMINA II



### LAMINA III

Corte longitudinal de la lentilla de la variedad Ojo de Cabra. Se nota en la parte más externa una capa de Esclerénquima empalizada (Ee) -ángulo superior derecho-. Adyacente se encuentra una capa pluriestratificada de células en cuyo interior se presentan acumulaciones (Ac) de taninos. Además se observan paredes celulares (Pc). Contraste de Fases 40x.

LAMINA III

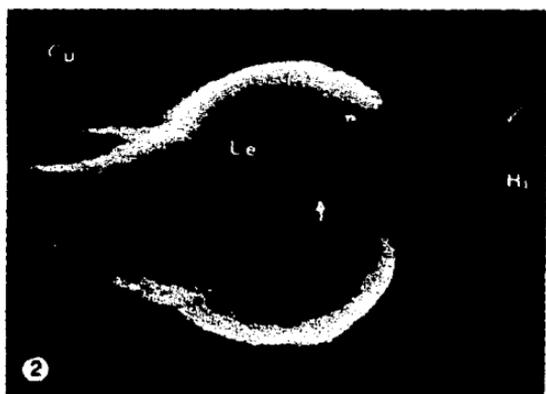


#### LAMINA IV

Fig. 1 Morfología externa de la región de la lentilla de la var. Michigan 800 con MEB. Se observa Cubierta seminal lisa (Cu), un región del hilio -ángulo superior derecho- y una fractura al lado contrario de la lentilla -ángulo inferior izquierdo- 66420x.

Fig. 2 Morfología externa de la lentilla de la variedad Ojo de Cabra con MEB. Se observa la cubierta seminal (Cu), una región del hilio (Hi) y la lentilla (Le) con una fisura en el centro de la misma (indicada por una flecha). 65610x.

LAMINA IV

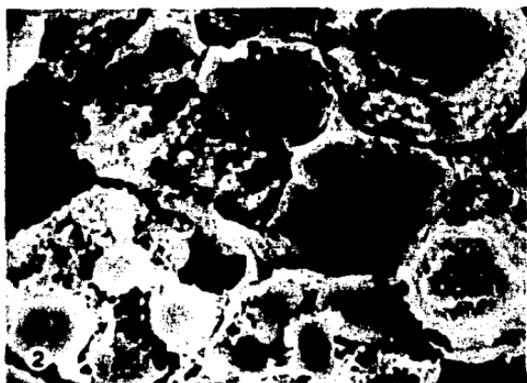
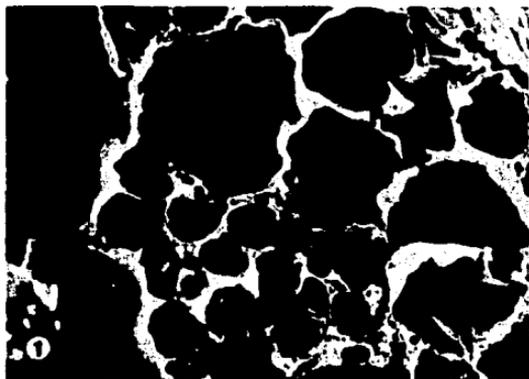


LAMINA V

Fig. 1 Cotiledón de la variedad Michigan 800 al MEB. Se observan paredes celulares (Pc) vacías y algunos gránulos de almidón (Al). 65396.7x

Fig. 2 Cotiledón de la variedad Ojo de Cabra al MEB. Se observa el protoplasto (Po), gránulos de almidón (Al), rodeados de cuerpos proteicos (Cp) y paredes celulares (Pc). 65342.7x

LAMINA V



## DISCUSION

Las gráficas del coeficiente de absorción de agua en las semillas de frijol de ambas variedades mostraron cómo los granos se van hidratando al paso del tiempo; haciendo una comparación de ambas gráficas durante las primeras horas, se observa como en la variedad Michigan 800 la velocidad de absorción de agua es mayor que en Ojo de Cabra. En ambas variedades la toma de agua por la semilla tiene un comportamiento de tipo exponencial en las primeras horas de remojo. Estos resultados coinciden con los hallazgos registrados por otros investigadores que mencionan que las primeras seis horas son críticas para la hidratación y la reorganización de las membranas celulares (Sefa-Dedeh y Stanley 1979a; Thimann, 1980; Moscoso et al. 1984).

La semilla de frijol en ambas variedades al someterla a hidratación presentó cambios evidentes, como el aumento de volumen. En el caso de la variedad Michigan 800 se produjo una fractura en la parte superior de la lentilla, probablemente debido a la presión ejercida por el embrión al aumentar de volumen. Es evidente que esta fractura abre otra vía de entrada de agua facilitando el reblandecimiento previo a la cocción (Hoff y Nelson citados por Silva et al., 1981).

Otra estructura anatómica que contribuye a facilitar la entrada de agua es el grosor de la cubierta seminal (Sefa-Dedeh y Stanley 1979b.) En Michigan 800 esta estructura es más delgada (Alvarado A. 1991, Comunicación Personal) que en Ojo de Cabra y ésto podría explicar el menor tiempo de hidratación de la primera

variedad con respecto a la segunda. El micrópilo, abertura que queda al cerrarse los tegumentos sobre la nucela durante el desarrollo de la semilla, es un paso directo hacia el embrión. En Michigan 800 el micrópilo se encuentra abierto en un 82% de los granos mientras que en Djo de Cabra este porcentaje es mucho menor, lo que representa un flujo directo de agua para Michigan 800. Con respecto a la estructura del hilo no se encontraron diferencias en ambas variedades. Excepto por este último párrafo, lo encontrado por Sefa-Dedeh y Stanley (1979b.) concuerda con estos resultados. Estos autores mencionan que si la cubierta de la semilla es gruesa, la velocidad de absorción del agua disminuye y que esta absorción está influenciada por el grosor de la cubierta, así como por las células externas en empalizada que justifica las propiedades de hidratación, al igual que el tamaño del micrópilo, del hilo y si están abiertos o cerrados.

Probablemente la apertura del micrópilo en Michigan 800 esté relacionado con la mayor velocidad de deterioro en esta variedad que en Djo de Cabra en el almacén, pues en estas condiciones Michigan 800 podría hidratarse más rápidamente que Djo de Cabra y se sabe que en condiciones de alta humedad y temperatura se acelera el deterioro de las semillas Kyle Randall (1964) citado por Sefa-Dedeh y Stanley (1979).

La cubierta seminal de las dos variedades está constituida por una capa de células columnares epidérmicas denominadas esclerénquima en empalizada, esto concuerda con lo reportado por Corner (1951) y Esau (1987); en el interior de estas células está presente un lumen celular de forma piramidal (con la base hacia el

interior de la capa), ésto se hace más evidente en la variedad Ojo de Cabra y coincide con lo reportado por Alvarado Franco (1991). Sin embargo éste autor menciona que la variedad Michigan 800 no presenta las mismas características en esta capa; lo cual, cabe señalar no coincide con resultados recientemente obtenidos mediante fijación con Oxido de propileno al 1% e inclusión en Epon (Esquivel, C.- Comunicación personal) quién observó que la forma del lúmen celular del esclerénquima en empalizada de ambas cubiertas es semejante. Todo esto posiblemente se deba, a que tanto Alvarado, A. (1991) en su trabajo, como en el presente, se trataron las semillas con la Técnica en Parafina y cortes gruesos, lo que no permitió la observación nítida de esta capa en la variedad Michigan 800. Sin embargo, al tratar la misma semilla con una técnica más fina permitió obtener cortes semifinos, que dió mayor detalle en esta estructura y se evidencia la semejanza en forma, no así en contenido y tamaño. Lo anterior no se encuentra registrado para frijol en la bibliografía consultada, aunque se reporta para otras leguminosas (Slattery, 1982).

La velocidad de hidratación en ambas variedades podría estar relacionada con el grosor de la capa de esclerénquima siendo un poco menor en Michigan 800 que en Ojo de Cabra, por lo tanto hidratándose más rápido la primera variedad.

La cantidad de taninos de la cubierta tanto en el lumen del esclerénquima como en el parénquima de la variedad Ojo de Cabra, aparentemente esta relacionado con el tiempo que requiere el grano para su cocción, ya que es mayor el tiempo que necesita este grano en comparación con la de la variedad Michigan 800, debido a

que Elías (1982) propone que la oxidación de polifenoles de la testa causada por la enzima polifenolasa provoca un oscurecimiento y una mayor impermeabilidad de la testa.

Rolston, (1978) también menciona que en semillas secas los taninos al oxidarse via enzimática y en presencia de oxígeno producen quinonas que se unen a proteínas formando complejos pigmentados e impermeables al agua. Ojo de Cabra que posee taninos puede impermeabilizar su cubierta restringiendo la entrada del agua resultando de este modo menos deteriorada que la variedad Michigan 800 que no los contiene.

En la capa adyacente se observaron las células "reloj de arena" en ambas variedades, estos resultados concuerdan con lo descrito para las leguminosas por Corner (1951) quien menciona que estas células tienen una posición y forma intermedia entre las células empalizada y las células del mesófilo, las células reloj de arena tienen los extremos expandidos con un ligero acinturamiento y presentan entre ellas espacios de aire.

La Microscopía Fotónica muestra la presencia de dos tipos de almidón, en las células del parénquima del cotiledón, uno con centro hialino y otro con centro de cristales o en forma de erizo, éste no se ha registrado. Sin embargo Holberg y Stanley, (1987) mencionan que durante el almacenamiento (10 meses, 30 C, HR 85%; 25 C, HR 65% y 15 C, HR 35%) hay cambios en la cristalinidad de los gránulos de almidón, con lo cual sugieren que también ocurren cambios en la estructura química de los almidones de frijol en estas condiciones; las cuales son independientes del ambiente.

Con respecto al contenido de almidón grumoso y acuoso,

Michigan 800 presenta menor cantidad del primero que del segundo tipo y Ojo de Cabra la situación contraria. Esta diferencia en ambos tipos de almidón podría ser la razón de que Michigan 800 se hidratara en un tiempo menor que Ojo de Cabra.

Con respecto a la cocción, es probable que en Michigan 800 se inicie más rápido la gelatinización del almidón y por lo tanto su tiempo de cocción sea menor. Ojo de Cabra al tener mayor cantidad de almidón grueso la gelatinización de este sería más lenta y su tiempo de cocción mayor.

Las células del parénquima del cotiledón de la variedad Ojo de Cabra, en semilla seca, presentaron inclusiones asociadas al almidón, vistas en cortes semifinos por Microscopía de luz (Esquivel, Comunicación personal) éste tipo de inclusiones no se observaron en la misma semilla remojada. Estas inclusiones no han sido reportadas en la bibliografía consultada.

No conocemos su naturaleza química, cabe mencionar que existen escasos trabajos del género *Phaseolus sp.* en México; sólo se han hecho estudios a nivel descriptivo, pero no se habían hecho comparaciones entre dos variedades de este género una suave y otra duca, por lo que se hace importante retomar este tipo de trabajos. Además de ser relevante por tomarse en cuenta una variedad (Ojo de Cabra) que es preferida por el agricultor por que es resistente a plagas, y que se puede sembrar en suelos pobres de nutrientes; y por el ama de casa por que no se deshace al cocerse. Otra variedad importante (Michigan 800) por ser una variedad blanda que no requiere mucho gasto de combustible para su cocción.

## CONCLUSIONES

Existen semejanzas y diferencias en las variedades trabajadas, estas son a diferentes niveles.

### a) Morfología Externa.

Ambas variedades presentan una cubierta seminal lisa; En la variedad Michigan 800 es de color blanco, en la variedad Ojo de Cabra es de color beige con manchas café chocolate.

La semilla de la variedad Michigan 800 es de forma casi esférica, y la de la variedad Ojo de Cabra tiene una apariencia mas arriñonada.

El micrópilo tiene aspecto diferente en ambas variedades. En la variedad Michigan tiene forma de 'V' y se encuentra obliterado en el 18% de las semillas; Sin embargo en la variedad Ojo de Cabra tiene forma de 'Y' y se encuentra obliterado en el 98% de los granos.

### b) Tamaño.

Hay diferencias en tamaño, la variedad Michigan es más pequeña (tiene 8.4mm de largo, 6.0mm de ancho y 4.7mm de profundidad) que la variedad Ojo de Cabra (tiene 11.9mm de largo, 6.9mm de ancho y 4.9mm de profundidad).

Hay diferencias en la proporción de ambas semillas, la variedad Michigan 800 cabe 1.7 veces en la semilla de la variedad Ojo de Cabra.

### c) Absorción de agua.

El tiempo en alcanzar el 50% de imbibición es diferente. La variedad Ojo de Cabra (susceptible al endurecimiento) lo alcanzó en 7:00 horas; 5:10 horas de diferencia con la variedad Michigan.

d) Morfología Interna.

La cubierta seminal de ambas variedades presenta dos cutículas, una que rodea a la capa de esclerénquima en empalizada y otra que separa a la cubierta de los cotiledones.

La capa de esclerénquima en empalizada de la testa, en ambas variedades, se encuentra formada por células alargadas y un lumen celular de forma piramidal con el extremo más ancho hacia el interior de la misma; en el que se evidenció la presencia de taninos, solo en la variedad Ojo de Cabra.

Ambas variedades presentan una monocapa de células llamadas reloj de arena, cuya forma típica es más evidente en la variedad Ojo de Cabra.

En la cubierta, la capa más interna en ambas variedades es una capa fibrosa, entre la cual se encuentran inclusiones de taninos presentes solo en Ojo de Cabra.

El hilo tiene un estrato pluriestratificado de células alargadas denominadas del súber, adyacente una doble capa de esclerénquima en empalizada con células alargadas y el estrato más interno formado por restos de paredes celulares.

En ambas variedades la lentilla está constituida por una capa de esclerénquima en empalizada, adyacente una capa pluriestratificada de células con sus paredes más o menos engrosadas, cuyo interior reacciona a taninos, al igual que el

lumen del esclerénquima de esta región.

La variedad Michigan 800 tiene cristales de naturaleza desconocida entre las células del parénquima del hilo, no presentes en Ojo de Cabra.

Se obtuvieron dos fracciones de almidón en ambas variedades; una denominada almidón acuoso y otra llamada almidón grueso. El almidón grueso se encontró en mayor proporción en la variedad Ojo de Cabra y el almidón acuoso en la variedad Michigan 800.

No se encontraron diferencias morfológicas entre almidón acuoso y almidón grueso, vistos a través de Sistemas de Polarización en ninguna de las dos variedades.

e) Observaciones cualitativas pusieron en evidencia que:

La variedad Michigan 800 presenta en su mayoría gránulos de almidón con centros en forma de erizo, en el caso de la variedad Ojo de Cabra son más numerosos los de centro hialino.

Son mas grandes y numerosos los gránulos de almidón que conforman el almidón grueso en ambas variedades.

Resumiendo Michigan 800 posee un tiempo de imbibición menor que Ojo de Cabra, lo que podría deberse a:

‡Su cubierta seminal más delgada

‡El micrópilo abierto en mayor proporción

‡La ausencia de taninos en la cubierta seminal

‡Mayor número de plasmodesmos entre las células cotiledonarias

‡Menor proporción de almidón grueso

Las características estructurales, histoquímicas y en la proporción de almidón grumoso/acuoso, podrían estar relacionadas con el tiempo de cocción menor para Michigan 800 y con un deterioro más acelerado en esta misma variedad.

## BIBLIOGRAFIA

Aguilera, J.M., Hau, M.I. and Villablanca W. 1986. The effect of solar drying and heating in the hardness of *Phaseolus* beans during storage. J. Stored Prod. Res. 22(4): 243-247.

Alvarado Franco Alma Leticia. 1991. El fenómeno del endurecimiento en relación con la estructura e histoquímica de la semilla seca de *Phaseolus vulgaris* var. Michigan 800 y var. Ojo de Cabra. Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias. UNAM. 64p.

Carabez-Trejo, A.; O. Paredes-López and C. Reyes-Moreno. 1989. Hard-to-cook (HTC) phenom in common beans. Influence of growing location and HTC acelerated procedures. International Journal of Food Science and Technology. 24: 535-542.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Trópical) Sin fecha. Guía de estudio: Morfología de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Cali, Colombia. 50p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) 1987. Informe CIAT Programa de frijol. Cali, Colombia. 39-55.

Corner, E.J.H. 1951. The leguminous seed. Phytomorfology. 1:117.

Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of

flowering plants. Columbia University Press. New York, USA.  
598-602.

Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América.  
1977. Semillas. CECSA. México. 1020p.

Díaz de León, S.F. 1989. Relación entre el grado de  
metilación de la pectina y el tiempo de cocción de algunas  
variedades de frijol. Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias,  
UNAM. México. 80p.

DGSV (Dirección General de Sanidad Vegetal). 1980. Malezas en  
los cultivos de Maíz, frijol, sorgo y arroz. México. 25p.

Elías, L.G. 1982. Conocimientos actuales sobre el proceso de  
endurecimiento del frijol. Archivos Latinoamericanos de Nutrición.  
32(2): 233-257.

Englesan, E.M. 1979. Contribuciones al conocimiento del  
frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México, Colegio de  
Postgraduados. Chapingo, México. 140p.

Esau, K. 1987. Anatomía de las plantas con semilla.  
Hemisferio Sur, Uruguay. 512p.

Gomez, M.E. 1982. Efecto de diferentes condiciones de  
almacenamiento sobre el desarrollo de la dureza del frijol.

Hahn, D.M.; Jones, F.T.; Akhavan, I. and Rockland, L.B. 1977. Light and Scanning electron microscope studies on dry beans: intracellular gelatinization of starch in cotyledons of large lima beans (*Phaseolus lunatus*). J. Food Sci. 42(5): 1208-1212.

Harper, J.L. 1977. Population biology of plants. Academic Press, Londres. 892p.

Hentges, D.L. C.M. Weaver, and S.S. Nielsen. 1990. Reversibility of the Hard-to-Cook Defect in Dry Beans (*Phaseolus vulgaris*) and Cowpeas (*Vigna unguiculata*). J. Food Sci. 55(5): 1474-1476.

Hincks, M.J. and Stanley, D.W. 1987. Lignification: Evidence for a role in hard-to-cook bean. J.Food Biochem. 11(1): 41-58.

Holberg, A.I. and D.W.Stanley. 1987. Har-to-cook Defects in Black Beans Protein and Starch Considerations. J.Agric.Food Chem. 35: 571-576.

Ishino, Keizo. 1976. Fraccionamiento y caracterizacion de las principales proteínas de reserva *Phaseolus vulgaris* L. 22p.

Jensen, W.A. 1962. Botanical Histochemistry Principles and Practice. W.H. Freeman Co. San Francisco. 406p.

Johansen, A.D. 1940. Plant Microtechnique. Mc. Graw-Hill. Unites States of America.

Jones, P.M.B. and Boulter, D. 1983. The cause of reduced cooking rate in *Phaseolus vulgaris* following adverse storage conditions. J. Food Sci. 48: 623-626.

Jones, T.F. et al. 1977. Light and Scanning Electron Microscope Studies of Dry Beans: Intracellular gelatinization of Starch in Cotyledons of Large Lima Beans (*Phaseolus lunatus*). J. Food Sci. 42(5): 1208-1212.

Kohashi-Shibata, J. 1990. Aspectos de la morfología y fisiología del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y su relación con el rendimiento. Chapingo, México. 44p.

López, R.G.F. 1988. Diversidad vegetal. Apoyos Académicos No.5 Chapingo, México. 105p.

Moreno, E. 1986 Hongos de granos almacenados: Su importancia y combate. En manejo y conservación de granos y semillas. P.U.A.L. UNAM.

Moreno, E. y J. Ramírez. 1987. Comportamiento de 7 variedades de frijol almacenados bajo diferentes temperaturas.

Moreno, P. N. 1984. Glosario Botánico Ilustrado. CECSA. México. 300p.

Moscoso, W.; M.C. Bourne and L.F. Hood. 1984. Relationships Between the Hard-to-cook Phenomenon in Red Kidney Beans and water Absorption Puncture Force, Pectin, Acid and Minerals. J. Food Sci. 49: 1577-1583.

Murray, R.D. 1984. Seed Physiology. Germination and Reserve Mobilization. Academic Press Inc. Australia. Vol. 2 p.34

Programa Nacional de Alimentación 1983-1988. Poder Ejecutivo Federal. México 270p.

Rao, M. A. and D. B. Lund. 1986. Kinetics of Thermal Softening of Foods a Review. Journal of Food Processing and Preservation 10:311-329.

Ramírez, G.J. 1987. Memoria del encuentro Latinoamericano sobre el almacenamiento y conservación de granos básicos. Endurecimiento de frijol. (21 al 25 de Septiembre).

Ramírez, G.J. 1990. Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el endurecimiento del grano de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Tesis Doctoral U.N.A.M. México. 63p.

Rodríguez, C.B. y M. C. Porras, M. 1985. Botánica

Sistemática. UACH. 424p.

Ruíz, O.M.; D. Nieto, R. e Ignacio Larios Rodríguez. 1950. Tratado Elemental de Botánica. Porrúa. México. 726p.

Rzedowski, J. y G. C. de Rzedowski. 1979. Flora Fanerogámica del Valle de México. CECSA. 403p.

Sánchez, S.O. 1978. La flora del Valle de México. Herrero. México. 513p.

SARH (Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos) 1985. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola Nacional. DGSV.

SARH. 1990. Variedades autorizadas de los principales cultivos con las indicaciones para las épocas de siembra y cosecha Ciclo Agrícola Primavera-Verano 1990. Dirección General de Política Agrícola Servicio Nacional y Certificación. México 150p.

SARH. 1990/1991. Variedades autorizadas de los principales cultivos con las indicaciones para las épocas de siembra y cosecha Ciclo Agrícola Otoño-Invierno 1990/1991. Dirección General de Política Agrícola Servicio Nacional y Certificación. México 138p.

Sefa-Dedeh, S. Stanley, D.W. and Voisey, P.W. 1978. Effects of soaking time and cooking conditions on texture and microstructure of Cowpeas (*Vigna unguiculata*). J.Food. Sci. 43: 1832-1838.

Sefa-Dedeh, S. and Stanley, D.W. 1979a. Textural implications of the microstructure of legumes. Food Technology. 33(10): 77-83.

Sefa-Dedeh, S. and Stanley, D.W. 1979b. The relationship of Microstructure of Cowpeas to water Absorption and Dehulling Properties. Cereal Chem. 56(4): 379-386.

Schwartz, F.H. et al. 1978. Problemas del campo en los cultivos de frijol en América Latina. CIAT. Cali, Colombia.

Silva, C.A.B., R.P. Bates y J.C. Deng 1981. Influence of soaking and cooking upon the Softening and Eating Quality of Black Beans (*Phaseolus vulgaris*) J. Food Sci. 46:1716-1725.

Slattery, H.D.; B.J. Atwell and J. Kuot 1982. Relationship between Colour, Phcnolic Content and impermeability in the seed Coat of various *Trifolium subterraneum* L. genotypes. Ann. Bot. 50:373-378.

Smith y J. Bruton. 1977. Atlas a Color de Técnicas de Coloración Histológica. Year Book Medical Publisher, Inc. Chicago. 192p.

Stanley, D.W. and J.M. Aguilera. 1985. A review of textural defects in cooked reconstituted legumes the influence of structure and composition. J. Food Biochem. 9:277-323.

Thimann, K.V. 1980. Senescence in plants. C.R.C. Press, Inc. Florida. Chapter 2. Senescence in seeds. 15-66p.

Tovar, J. I. M. Bjorck, and Nils-Georg Asp. 1990. Analytical and Nutritional Implications of Limited Enzymic Availability of Starch in Cooked Red Kidney Beans. J. Agric. Food Chem. 38(2):488-493.

Weier, E.T.; Stocking, G.R. y Michael C.B. 1980. Botánicas. Lima. 655p.