



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**REMOVILIZACIÓN DE NUTRIENTES BAJO
CONDICIONES AMBIENTALES ADVERSAS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

PRESENTA

YESSICA GONZÁLEZ CASTRO



MÉXICO, D.F. 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS
VOCAL:	MIREYA RODRÍGUEZ PENAGOS
SECRETARIO:	SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
1er. SUPLENTE:	EUCLIDES ÁVILA CHÁVEZ
2° SUPLENTE:	AURORA LARA NÚÑEZ

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

SUSTENTANTE:

ÍNDICE

ÍNDICE	iii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.	2
Características generales del frijol.	2
Importancia del frijol en México.	2
Desarrollo de la semilla de frijol.	4
Síntesis de sacarosa.	7
Regulación en la Síntesis de Sacarosa	10
Condiciones climáticas durante el período de maduración de la semilla	11
Importancia de la Removilización de nutrientes	11
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	13
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS PARTICULARES	13
MATERIALES Y MÉTODOS.	14
MATERIAL BIOLÓGICO	14
ANÁLISIS DE PESO EN VAINAS Y SEMILLAS	15
CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES.	15
ACTIVIDAD DE SACAROSA FOSFATO SINTASA (SPS)	16
RESULTADOS.	18
DISCUSIÓN.	27
• En condiciones ambientales adversas la removilización de nutrientes es una alternativa para favorecer la formación de la semilla.	27
• Los azúcares como medio de remoción de nutrientes de los órganos de la planta hacia la semilla.	29
• SPS, enzima reguladora de las cantidades de reservas en las semillas y posible participante en el fenómeno de removilización de nutrientes.	30
CONCLUSIONES.	32
LITERATURA CITADA	33

RESUMEN

La semilla de frijol es un producto de comercialización muy importante que en México es básico para la alimentación de muchas familias. Al igual que otros cultivos, su producción disminuye cuando el ambiente es adverso. Es por esta razón que nos interesa conocer las alternativas que tienen las plantas de frijol para lograr el desarrollo exitoso de las semillas, aún cuando las condiciones climáticas no sean las ideales.

Removilizar nutrientes acumulados en diferentes órganos y canalizarlos hacia las semillas en formación, parece ser una de las escasas posibilidades que tiene la planta para responder a un ambiente hostil. En este estudio se recrearon tres condiciones que limitan la disponibilidad de los nutrientes demandados por las semillas en desarrollo (prematura remoción de la vaina, defoliación y sequía). El análisis de los resultados nos permitió evaluar la importancia relativa de éste proceso en diferentes genotipos de frijol.

El objetivo más importante del presente trabajo es caracterizar los factores que están involucrados en la removilización de nutrientes hacia la semilla, y a partir de su análisis, hacer una búsqueda de genotipos que sean eficientes cuando el ambiente de crecimiento no sea propicio.

Los resultados muestran que en condiciones normales la aportación de la vaina hacia las semillas es poco significativa. Sin embargo, bajo condiciones que reducen la disponibilidad de nutrientes, su contribución se vuelve muy importante.

La importancia de la removilización de nutrientes no es igual en todos los genotipos analizados, y contrario a lo que pensábamos en un inicio, la removilización de las reservas acumuladas como almidón, no siempre son suficientes para que el desarrollo de la semilla sea adecuado.

INTRODUCCIÓN.

Características generales del frijol.

El frijol pertenece a la familia Fabacea, subfamilia Papilionoideae, tribu Phaseolae, y especie *Phaseolus vulgaris* L. Tiene un alto contenido proteico (20-25%), además de ser el tercer cultivo más importante de leguminosas en el mundo (Singh et al., 1999). Otro de los beneficios de su consumo radica en la capacidad que tiene de disminuir los niveles de colesterol y reducir los riesgos de padecer cáncer (Anderson y Gustafson, 1989). En México es la leguminosa de mayor consumo humano, representando el 36% de la ingesta diaria (Lara, 2015).

Las plantas de frijol son hierbas rastreras y trepadoras con folíolos de tres hojas. El color de sus flores tiene tonalidades rosas, lilas y violetas. Sus semillas, lo que conocemos como frijol, tienen forma de riñón y crecen en una vaina comestible como legumbre (ejotes). Como otras leguminosas, estas plantas tienen nódulos en sus raíces con bacterias fijadoras de nitrógeno.

Importancia del frijol en México.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés), la producción mundial de frijol en el año 2007 fue de 17.0 millones de toneladas. De acuerdo con dicho organismo, el principal productor de éste fue la India, que contribuyó con el 23.1% de la cosecha mundial. Brasil (18.6%), Myanmar (14.7%), China (7.2%), Estados Unidos (6.8%) y México (5.8%), completaron la lista de los productores más importantes. Estos datos se muestran en la **Figura 1**.

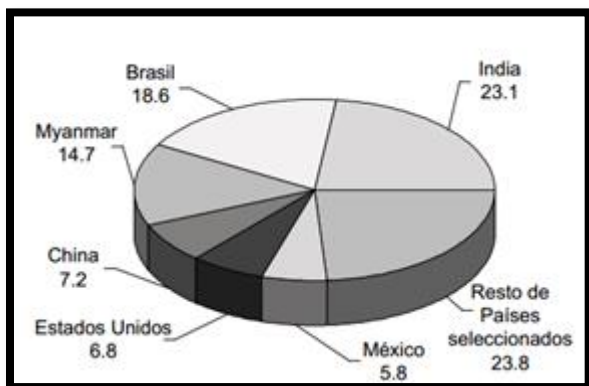


FIGURA 1. Contribución de los principales países productores de frijol a nivel mundial en 2007 (Departamento de Agricultura, FAO).

En México el cultivo de frijol está profundamente arraigado, fue esencial en la dieta alimenticia de las culturas prehispánicas y en la actualidad se usa en la elaboración de los alimentos más tradicionales, por lo que constituye un elemento de identificación cultural de los mexicanos.

Esta leguminosa es fundamental en la economía campesina, representa una fuente importante de ocupación e ingreso, así como una garantía en seguridad alimentaria, pues se estima que el 20% de la producción nacional se destina al autoconsumo. Además, es un alimento rico en proteínas y probablemente la fuente más importante de las mismas para los sectores de bajos recursos económicos (INEGI, 2007).

El último censo realizado por el INEGI en 2007, reporta que la superficie cultivada con frijol, sólo fue superada por la que se dedicó a la siembra de maíz. Sin embargo, aproximadamente el 87 % de la superficie destinada al cultivo de frijol se ubica en áreas de temporal, el cultivo se caracteriza por los bajos rendimientos (en 2008 el rendimiento promedio a nivel nacional fue de 0.67 ton/ha) y es muy vulnerable a las condiciones climatológicas que prevalecen durante el ciclo productivo, siendo la escasa disponibilidad de agua, el ataque de plagas y enfermedades y la baja fertilidad de los suelos algunas de las principales limitantes de su producción. Desde hace muchos años México es importador de frijol, sin embargo, en 2011 la producción apenas alcanzó el 50% de la lograda el año anterior, y fue necesario importar 96,897 ton. de frijol negro y 132,053 ton. de otras variedades, cantidades significativamente mayores a las que han importado en años anteriores (ASERCA, 2012). Este panorama plantea la necesidad urgente de hacer investigaciones que faciliten el desarrollo de variedades comerciales capaces de enfrentar exitosamente condiciones ambientales adversas.

En el mundo se conocen alrededor de 150 especies de frijol, de las cuales aproximadamente 70 variedades se cultivan en México. Se distribuyen en siete grupos: negros, amarillos, blancos, morados, bayos, pintos y moteados. Las variedades de mayor consumo son: azufrado, mayocoba, negro Jamapa, peruano, flor de mayo y junio. Las de consumo intermedio son: garbancillo, manzano, negro

San Luis, negro Querétaro y pinto, y las de menor preferencia son: alubia blanca, bayo blanco, negro zacatecas, ojo de cabra y bayo berrendo (Lara, 2015).

Desarrollo de la semilla de frijol.

El ciclo biológico de las plantas anuales culmina con la formación de semillas capaces de germinar. En el caso particular de frijol, el proceso puede dividirse en diez etapas de crecimiento (CIAT, 1986).

Etapa 0: Germinación. Inicia cuando la semilla sembrada absorbe agua y se hincha. La cubierta es rota por la radícula, que continuará alargándose para convertirse en raíz primaria; después aparecerán las raíces secundarias. El siguiente paso es el alargamiento del hipocotilo.

Etapa 1: Emergencia. El hipocotilo se endereza y crece hasta alcanzar su máximo tamaño, los cotiledones se observan en la superficie del suelo y las partes expuestas a la luz adquieren un color verde.

Etapa 2: Aparición de hojas primarias. Estas son simples y se encuentran en posiciones opuestas.

Etapa 3: Primera hoja trifoliada. En esta etapa los cotiledones ya se han secado completamente y por lo regular se han caído. Es posible que a partir de la yema que está en la axila de la primera hoja trifoliada se forme una rama. El número y la longitud de las ramas dependen tanto del genotipo como de las condiciones de cultivo.

Etapa 4: Tercera hoja trifoliada. En esta etapa se despliegan el resto de las hojas.

Etapa 5: Inicio de la floración. La aparición de los primeros botones florales marca el inicio de la fase reproductiva.

Etapa 6: Floración. Inicia cuando está abierta la primera flor en el 50% de las plantas.

Etapa 7: Formación de las vainas. Después de la fecundación de la flor, la corola se marchita y la vaina comienza a crecer. Esta etapa termina cuando la vaina alcanza su máxima longitud.

Etapa 8: Llenado de las vainas. Esta etapa se inicia cuando la vaina termina su crecimiento y se caracteriza por la acumulación de sustancias de reserva en las semillas, las cuales pueden distinguirse como abultamientos en la vaina.

Etapa 9: Maduración. En esta etapa el color de las vainas cambia de verde a amarillo; las hojas inferiores, adquieren un color amarillo y se caen. Eventualmente se seca toda la planta y el contenido de agua de las semillas baja hasta llegar a un 15%. En la **Figura 2**, se presentan fotos de algunas de estas etapas.

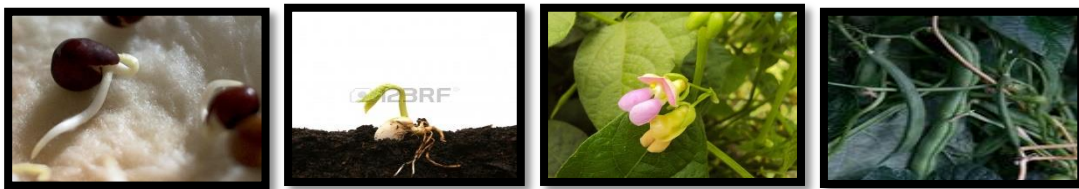


FIGURA 2. Algunas etapas durante el desarrollo de plantas de frijol. A. Germinación, B. Emergencia, C. Floración y D. Aparición de vainas.

Los componentes más importantes de la semilla de frijol son carbohidratos, proteínas y lípidos, los cuales representan el 61, 22 y 1.5 %, respectivamente del peso de la semilla seca (FAO).

Visto con más detalle, en las semillas de las leguminosas se distingue la cubierta de la semilla, la cual tiene un origen materno y entre sus funciones está proteger al embrión y facilitar la distribución de los nutrientes necesarios. El embrión es diploide mientras que el endospermo es triploide y ambos son producto de la doble fertilización. Durante el desarrollo de la semilla el embrión sufrirá una serie de divisiones celulares que eventualmente originarán órganos especializados, mientras que el endospermo, que en un principio funciona como almacén de sustancias de reservas, desaparecerá a medida que el embrión crezca y ocupe el

espacio (Sabelli y Larkins, 2009). La acumulación de almidón y proteínas en el embrión, hacen necesario que los niveles de sacarosa se incrementen. En la etapa de acumulación de reservas no existe una conexión directa entre el embrión y la planta madre (Patrick and Offler, 2001, **Figura 3**). Sin embargo, la cubierta seminal (de origen materno) libera cantidades importantes de sacarosa, glutamina y alanina a la vacuola en donde se desarrolla el embrión, el cual los incorpora por medio de transportadores específicos (Melkus et al., 2009). En caso particular de la sacarosa, esta es importada del apoplasto mediante transportadores sacarosa/H⁺ localizados en las células epidérmicas y subepidérmicas del cotyledon (Rosche et al., 2002).

La invertasa asociada a la pared celular de la cubierta de las semillas participa en controlar qué tipo de azúcares están disponibles para el desarrollo de los embriones. La alta actividad que se observa en las etapas iniciales incrementa la concentración de hexosas en el endospermo, y de alguna manera promueve la división celular en el embrión. Un poco más adelante, la actividad de la invertasa asociada a la pared de las cubiertas seminales disminuye y aumenta la concentración de sacarosa. Esto último constituye una señal que promueve la acumulación de sustancias de reserva (Weber et al., 1996).

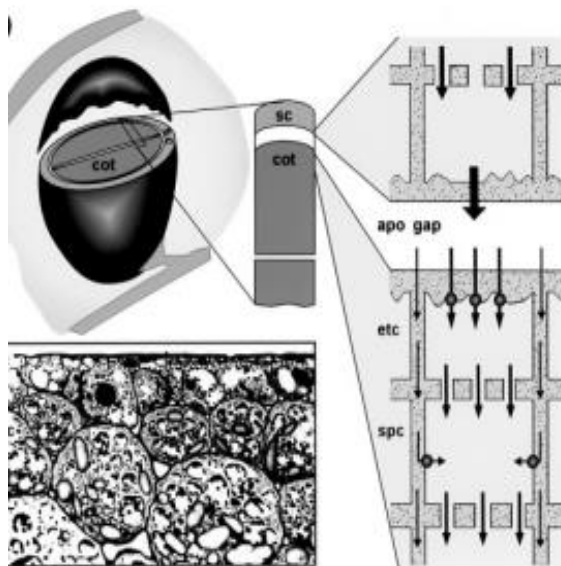


Figura 3. Vía de transporte de sacarosa en las semillas en desarrollo. Se muestra la ausencia de conexiones entre la cubierta seminal y el embrión, así como el papel de los transportadores de sacarosa que participan en su asimilación (Rosche et al., 2002).

Síntesis de sacarosa.

La fijación de CO₂ ocurre en el cloroplasto a través del Ciclo de Calvin. En la **Figura 4** se muestra que las triosas fosfato obtenidas en el ciclo de Calvin pueden tener tres destinos: 1) Regeneración del ciclo 2) Síntesis de almidón en el cloroplasto y 3) Síntesis de sacarosa en el citosol (García et al., 2006).

El transporte de las triosas fosfato del cloroplasto al citosol está mediado por el **translocador de fosfatos** el cual transporta al citosol una molécula de triosas fosfato e introduce otra de P_i, lo que contribuye a mantener constantes los niveles de fosfato dentro del cloroplasto (García et al., 2006), lo cual es de gran importancia para la síntesis de intermediarios fosforilados y la síntesis de ATP.

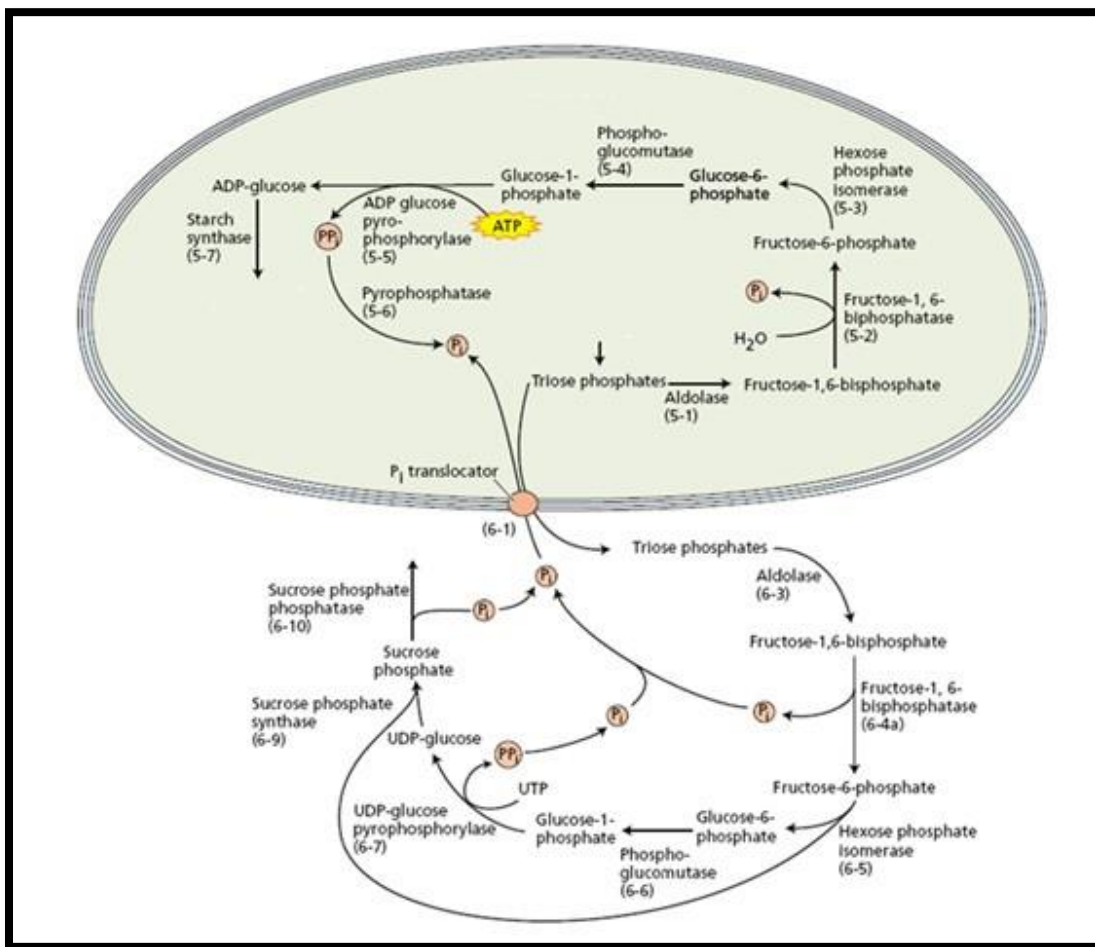


Figura 4. Síntesis de sacarosa a partir de triosas fosfato (García et al., 2006).

El almidón es una forma de almacenar una gran cantidad de carbohidratos sin que eso tenga consecuencias osmóticas importantes. Puede ser una reserva a corto o a largo plazo. El que se acumula en las hojas funciona como reserva a corto plazo, pues la mayor parte del almidón sintetizado durante el día se degrada por la noche. En cambio, el almidón que se almacena en las semillas constituye una reserva a largo plazo (Audesirk et al., 2001).

Como ya se mencionó anteriormente, la síntesis de sacarosa tiene lugar en el citosol a partir de triosas fosfato que vienen del ciclo de Calvin, las cuales se convierten en fructosa-1,6-bisfosfato, después en fructosa 6-fosfato y finalmente por isomerización a glucosa 1-fosfato. La UDP-glucosa pirofosforilasa puede convertir glucosa 1-fosfato en UDP-glucosa. A partir de UDP-glucosa y fructosa 6-fosfato, la sacarosa fosfato sintasa (SPS) sintetiza sacarosa fosfato, de la que posteriormente es desfosforilada por la sacarosa fosfatasa (**Figura 5**) (Peretó, 1996).

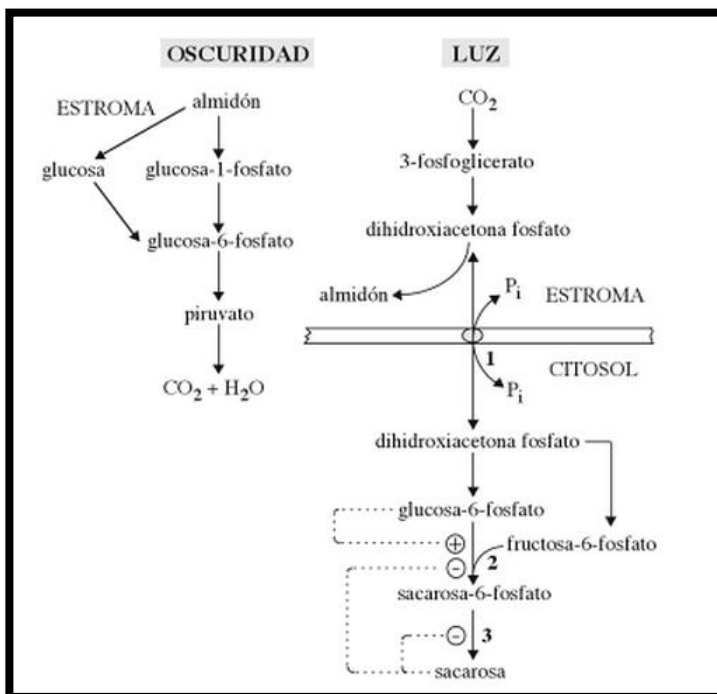


Figura 5. Metabolismo de los azúcares en una célula fotosintética. 1) Representa el translocador triosas P/P 2) Representa a la sacarosa fosfato sintasa (SPS) y 3) Representa a la Sacarosa 6-P fosfatasa (Peretó, 1996). También se indica el efecto positivo de glucosa 6-P sobre la actividad de SPS, y la inhibición de las actividades de SPS y Sacarosa 6-P fosfatasa por sacarosa.

La sacarosa es un disacárido de glucosa y fructosa. Al estar unidos los grupos reductores, la molécula es no reductora, lo que es una ventaja para el transporte.

Recordemos que los embriones de las plantas de frijol no tienen conexiones con la planta madre y la asimilación de sacarosa depende de la actividad de transportadores membranales que la introducen en contra de un gradiente de concentración. En el interior de las células, la sacarosa puede ser transformada en glucosa y fructosa por la acción de la invertasa citosólica o en UDP-glucosa y fructosa por la sacarosa sintasa.

La invertasa (β -fructofuranosidasa) es una enzima que cataliza la ruptura hidrolítica de la sacarosa en glucosa y fructosa. En las células vegetales existen 3 variantes de esta enzima: la vacuolar, cuyo pH óptimo está entre 4.5 y 5.0, la alcalina o neutral, ubicada en el citoplasma y cuyo pH óptimo está entre 6.8 y 8.0 y la localizada en la pared celular con un pH óptimo ácido (Zrenner et al., 1996). La contribución de cada una de ellas a la hidrólisis de sacarosa se basa fundamentalmente en medir la actividad a diferentes valores de pH.

Los niveles de actividad de las enzimas que convierten y metabolizan la sacarosa, tienen mucho que ver con su distribución en la planta, por lo que su inducción en fases tempranas del desarrollo de las semillas es un elemento importante para garantizar su formación exitosa (Geiger et al., 1989). En las etapas muy tempranas de desarrollo de la semilla, la sacarosa es hidrolizada por las invertasas de la pared celular, lo que se refleja en la alta concentración de hexosas (y poca sacarosa) en el interior del endospermo en donde está creciendo el embrión. Esta situación poco después se invierte (Morley-Smith et al., 2008). En semillas de leguminosas la sacarosa es inductor del proceso de maduración pues promueve la expansión celular y la acumulación de reservas en los cotiledones (Weber et al., 2005).

Regulación en la Síntesis de Sacarosa

La Sacarosa Fosfato Sintasa (SPS) en su forma nativa es un dímero cuyas subunidades pesan entre 120 y 138 KDa, sin embargo, puede formar complejos con otras proteínas (sacarosa 6-P fosfatasa, la cinasa responsable de su fosforilación (SPSk) y proteínas 14-3-3) Cataliza la reacción:



La desfosforilación de sacarosa 6-P desplaza el equilibrio hacia la síntesis de sacarosa. La actividad de esta enzima está sometida a una regulación compleja que involucra la fosforilación y el efecto de Pi y glucosa 6-P. La enzima puede fosforilarse en múltiples sitios, sin embargo se ha establecido que la fosforilación de Ser158 en hojas de espinaca y Ser162 en hojas de maíz es la relevante. Glucosa 6-P es un activador alostérico, mientras que Pi, actúa como un inhibidor efectivo. La fosforilación es muy importante para regular los cambios en la actividad de SPS en la transición luz/oscuridad. En espinaca durante la noche el sitio Ser158 aparece fosforilado y la enzima es mucho más sensible al efecto inhibitorio de Pi, durante el día, ese sitio se desfosforila y el efecto negativo de Pi sobre la actividad disminuye (Huber and Huber, 1996).

La actividad de SPS se incrementa durante el día y bajo condiciones de estrés osmótico (sequía) y los azúcares (glucosa) promueven la expresión del gen y eventualmente son responsables de que la actividad de SPS se incremente (Hesse et al., 1995).

La actividad de SPS está sujeta a una regulación que involucra la fosforilación y la modulación alostérica. Altos niveles de glucosa 6-fosfato estimulan la actividad de SPS, mientras que niveles elevados de Pi tienen un efecto contrario. Por otro lado, la enzima muestra su máxima actividad cuando está desfosforilada y la fosforilación en un residuo de serina la convierte en una forma menos activa. Los reguladores alostéricos también son muy importantes para definir el estado de fosforilación, la actividad de la SPS cinasa se inhibe por glucosa 6-fosfato, mientras que la de SPS fosfatasa es inhibida por Pi (Weiner et al., 1992).

Condiciones climáticas durante el período de maduración de la semilla

Existen 2 etapas en las cuales la maduración de las semillas es altamente susceptible a condiciones climáticas adversas (FAO). La primera corresponde al periodo en el que las semillas acumulan materia seca en forma de sustancias de reserva. Si la disponibilidad de fotosintatos se reduce como consecuencia de la falta de humedad en el suelo, la presencia de plagas y enfermedades, etc., las semillas serán más livianas. Es posible que su potencial de almacenamiento también se vea afectado y que al germinar las plantas también sean menos eficientes en su desarrollo. La segunda etapa, está relacionada con el secado. Si durante esta etapa llueve mucho, la deshidratación será lenta y el contenido de humedad permanecerá elevado por un período mayor, lo que propicia que las semillas se deterioren con rapidez.

Importancia de la Removilización de nutrientes

Normalmente, la mayor parte del carbono que se acumula en las semillas proviene de la actividad fotosintética que la planta realiza durante el periodo en que se están sintetizando las sustancias de reserva. Si las condiciones ambientales no son adecuadas, otros órganos pueden exportar nutrientes que son canalizados a la formación de las semillas. Se ha estimado que de cada 100 unidades de carbono asimiladas por la planta, 52 son incorporadas a las semillas y 37 se acumulan en la vaina. Posteriormente, parte de los recursos acumulados en la vaina son transferidos gradualmente a las semillas (Pate et al., 1977).

Se han encontrado correlaciones fuertes entre los índices del área foliar y el rendimiento de las semillas (Pechan y Morgan, 1985). De igual manera, los efectos negativos sobre la formación de semillas de factores que reducen la actividad fotosintética en el periodo posterior a la floración están igualmente documentados. Por ejemplo, la reducción en el peso de vainas y semillas cuando

las plantas de *Brassica* se defoliaron al momento de la floración (Pechan y Morgan, 1985).

Bajo esas condiciones, la removilización de nutrientes se vuelve muy importante. Se ha observado que la concentración de proteína en las vainas alcanza su máximo a 3 semanas después de la floración y se reduce a 37 % entre las semanas 3 y 6 después de la floración, cuando tiene lugar la acumulación máxima de proteínas de reserva en la semilla (Staswick, 1989).

La senescencia es un proceso complejo y altamente regulado que termina con la muerte de los órganos. Las características de éste proceso en las hojas permite la removilización de nutrientes, especialmente de compuestos nitrogenados a las partes que aún están en crecimiento. Condiciones ambientales adversas pueden acelerar el proceso (Jansson y Thomas, 2008). Los nutrientes removilizados de los órganos senescentes son muy importantes para la producción de los cultivos (Gregersen et al., 2013), pues se ha estimado que el 70% del nitrógeno acumulado en las semillas de chícharo proviene de las hojas en senescencia (Peoples y Dalling, 1988).

También se ha reportado que genotipos de frijol con alta capacidad de resistencia a sequía se caracterizan por ser altamente eficientes en la removilización de nutrientes (Cuellar-Ortiz et al., 2008).

Los frutos de frijol que son removidos de las plantas en el periodo comprendido entre los 10 y los 30 días después de la floración, son capaces de movilizar reservas acumuladas en las vainas para permitir el desarrollo de las semillas (Fountain et al., 1989). Esta es una característica que también se ha observado en los frutos de otras leguminosas como haba, chícharo (Flinn y Pate, 1968) y soya (Thorne, 1979). Es posible que el análisis de la capacidad de diferentes genotipos para removilizar nutrientes, permita la identificación de individuos notables que puedan ser usados en programas de mejoramiento.

HIPÓTESIS

Existen genotipos de frijol en los que la movilización de reservas acumuladas en diferentes órganos, es usada con éxito para favorecer el desarrollo de las semillas bajo condiciones ambientales adversas que limitan la disponibilidad de nutrientes.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar el proceso de removilización de nutrientes y evaluar la capacidad de diferentes genotipos de frijol para favorecer la formación de semillas cuando las plantas son sometidas a condiciones ambientales que reducen la disponibilidad de nutrientes.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si la removilización de nutrientes es una alternativa que las plantas usan para favorecer el desarrollo de la semilla, cuando las condiciones de crecimiento no son ideales.
- Analizar la importancia relativa de los nutrientes removilizados en diferentes órganos de la planta.
- Investigar si hay genotipos de frijol que lleven a cabo este proceso con mayor eficiencia.
- Evaluar la importancia de la removilización de los azúcares acumulados en la vaina hacia la semilla.
- Investigar si hay cambios en la actividad de la sacarosa fosfato sintasa (SPS) en vainas y semillas, que pudieran estar asociados a la removilización de los nutrientes y a la acumulación de las reservas en las semillas.

MATERIALES Y MÉTODOS.

MATERIAL BIOLÓGICO

Los genotipos usados tienen hábitos de crecimiento y ciclos biológicos similares. Fueron utilizados para estudiar el proceso de removilización y formación de semillas bajo condiciones de severa limitación de nutrientes. A partir de los resultados obtenidos se podrán analizar otros genotipos más eficientes.

Para este estudio se seleccionaron 8 variedades de frijol, genotipo 15, 42, 40, 22, 32, 17, 26 y Canario. En el siguiente listado se muestran los nombres verdaderos de algunos genotipos antes mencionados:

15 – V8025
22 – MAR1
26 – G17649
32 – BAT447
42 – G22179

Es importante señalar que solo el genotipo Canario es utilizado comercialmente), se germinaron en papel húmedo a una temperatura de 25°C y después trasplantadas a macetas con 3 L de agrolita. Las plantas se cultivaron en un invernadero donde las temperaturas promedio fueron 25°C durante el día y 18°C durante la noche. Todos los días se regaron con agua desionizada y cada tercer día con 200 mL de solución de Hoagland, constituida por 3 mM KNO₃, 2mM Ca(NO₃)₂, 1 mM MgSO₄, 0.004 mM MnCl₂, 0.023 mM H₃BO₃, 0.0004 mM ZnSO₄, 0.00015 mM CuSO₄, 0.00005 mM H₂MoO₄ y 5 gl⁻¹ de FeEDTA (Jones, 1982). Las flores se marcaron el día en que abrieron y la edad de los frutos se estableció en días después de la floración (DDF). Los frutos que fueron removidos, se cortaron cuando cumplieron 20 DDF, se incubaron en oscuridad a 25°C y se analizaron a 1, 2, 3 y 5 días después de que fueron removidos. Los resultados se compararon con frutos de la misma edad que continuaron con su crecimiento unidos a las plantas.

Las plantas que se sometieron a sequía se dejaron de regar cuando los frutos seleccionados alcanzaron 20 DDF. En las plantas que fueron defoliadas cuando

los frutos seleccionados cumplieron 20 DDF se removió el 66% del área foliar (2 trifolios en cada hoja).

ANÁLISIS DE PESO EN VAINAS Y SEMILLAS

Vainas y semillas de frutos de los 8 genotipos de frijol obtenidos bajo las cuatro condiciones de crecimiento (control, sequía, defoliación y frutos removidos), se secaron a 50 °C hasta alcanzar un peso constante.

CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES.

El material usado para este análisis se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C. Para la cuantificación de azúcares el material se molió en un mortero con 1.5 mL de etanol al 80% y se colocó en tubos eppendorf. Se calentaron a 80°C por 15 min y cuando se enfriaron se comprobó que todas las muestras tuvieran el mismo volumen. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se colocó en un tubo nuevo y se usó para determinar la cantidad de azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa), mientras que la cantidad de almidón se determinó en la pastilla.

La medición de los niveles de azúcares, se realizó en placas de Elisa, utilizando un método enzimático acoplado a la producción de NADH. Se agregaron 150 µL por pozo de una mezcla de reacción constituida por 25 mM HEPES (pH 8.0), 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 0.3 mM NAD⁺ y 1 U/ml de Hexocinasa. Se completó con 10 µL de la muestra y 40 µL de H₂O.

El ensayo se dividió en 4 etapas. En la primera se registró la lectura de la absorbancia a 340 nm de la mezcla de reacción. En la segunda etapa se agregaron 0.2 U (en un volumen de 10 µL) de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

(G6PDH) y se registró la lectura estable a 340 nm; en las etapas 3 y 4 se siguió el procedimiento anterior, agregando 0.2 U (en un volumen de 10 μ L) de fosfato glucosa isomerasa (PGI) y 1 U (en un volumen de 10 μ L) de Invertasa, respectivamente. Paralelamente se hicieron curvas patrón para glucosa, fructosa y sacarosa las cuales se usaron para calcular por interpolación la cantidad de los diferentes azúcares presentes en las muestras.

Para la cuantificación del almidón, la pastilla se resuspendió en 250 μ L de agua, y se calentó a 90°C por 3 h. Posteriormente se agregaron 750 μ L de acetato de sodio 0.2 M y pH 4, con 20 U de amiloglucosidasa. Se dejó incubando toda la noche a 37°C. Al día siguiente se centrifugó a 500 rpm por 5 min y se determinó la cantidad de glucosa en el sobrenadante.

ACTIVIDAD DE SACAROSA FOSFATO SINTASA (SPS)

Para la determinación de la actividad de sacarosa fosfato sintasa, 0.5 g de tejido se homogenizaron en un mortero con 2 ml de un amortiguador compuesto por 50 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10% glicerol, 0.1% tritón X-100, 2 mM ácido aminocapróico, 1 mM DTT, 2 mM benzamidina, 0.5 mM PMSF y 2 g polivinil polipirrolidona insoluble (PVPP). La suspensión se puso en un tubo eppendorf y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min. Se tomó 1 ml del sobrenadante y se desaló en una columna de sephadex G-10 equilibrada en el mismo amortiguador (sin PVPP). El material desalado se usó para medir la actividad de la enzima. La mezcla de reacción contuvo 10 mM UDP-glucosa, 10 mM fructosa 6-fosfato, 40 mM glucosa 6-fosfato, 2.5 mM DTT, 15 mM $MgCl_2$, 50 mM HEPES (pH 7.4). En este caso se utilizaron tubos de ensayo de 12x100, en los que se colocaron 25 μ L de extracto, 40 μ L de la mezcla de reacción y cantidad suficiente de H_2O para completar 70 μ L. La reacción se incubó a 37°C por 10 min y se detuvo agregando 70 μ L de KOH al 30%. Posteriormente se mantuvieron en ebullición durante 10 minutos. Finalmente se agregó 1.5 mL de Antrona (150 mg/100 mL H_2SO_4 70%) por tubo. Los tubos se incubaron a 37°C durante 10

minutos y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm. La cantidad de sacarosa se calculó interpolando las lecturas en una curva patrón que se construyó de manera simultánea al análisis de las muestras. La cuantificación de sacarosa con antrona se basa en la hidrólisis que sufre en un medio ácido y en la conversión de los productos en furfurales o hidroximetil furfurales, que son los que reaccionan con la antrona.

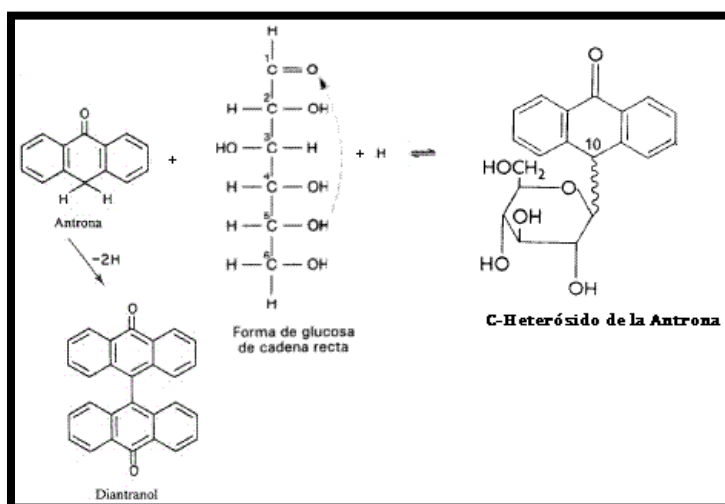


Figura 6. Reacción que se lleva a cabo al utilizar el método de antrona para la medición de la actividad de Sacarosa Fosfato Sintasa (SPS).

RESULTADOS.

Para caracterizar el efecto de condiciones ambientales adversas en el proceso de desarrollo de las semillas de los genotipos 15, 17, 22, 26, 32, 40, 42 y Canario, se obtuvieron los pesos secos de vainas y semillas tanto en condiciones ideales, como de frutos que a los 20 días después de la floración (momento en que la vaina alcanza su peso máximo e inicia la acumulación de reservas en las semillas), fueron removidos de la planta o de plantas defoliadas (a un 66%) o sometidas a una sequía terminal (no se volvieron a regar). En la **Figura 7** podemos observar fotografías de las semillas de seis de los genotipos utilizados en este estudio. En ellas podemos observar la diferencia en el desarrollo de las semillas cuando la vaina es removida y cómo algunas especies son más eficientes ante este tipo de estrés.

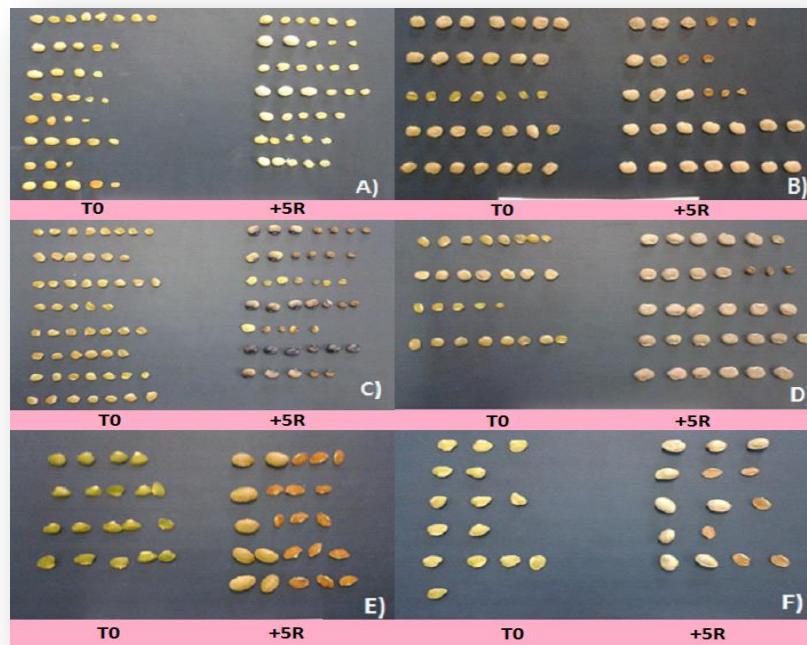


Figura 7. Genotipos utilizados en el estudio. Se observa el desarrollo de las semillas a los 20 y 25 días. En todas las imágenes se encuentran del lado izquierdo las semillas al tiempo cero (T0), todas fueron cortadas de la planta a los 20 días, pero las del lado derecho se mantuvieron en incubación durante 5 días más (+5R), en total su desarrollo fue de 25 días. (A) Genotipo 26, (B) Genotipo 32, (C) Genotipo 42, (D) Genotipo 22, (E) Genotipo 15, (F) Genotipo Canario.

La diferencia entre el peso seco final y el peso seco registrado a los veinte días después de la floración permitirá observar si existe alguna relación entre los cambios en los pesos de semillas y vainas durante este periodo. La **Figura 8** muestra los resultados obtenidos para el genotipo 15. En ella se observa que en condiciones ideales de crecimiento el peso seco de la vaina sufre una pequeña reducción en comparación con el incremento que se aprecia en el peso seco de las semillas. En condiciones ambientales adversas se observan cambios importantes. Cuando los frutos son removidos, la disminución en el peso de las vainas incrementa el doble, sin embargo, el incremento en el peso de las semillas es muy pequeño. Ocurre algo muy similar en los datos de plantas expuestas a defoliación. Mientras que en condiciones de sequía, no obstante que la vaina pierde una cantidad de materia similar que en las plantas defoliadas, las semillas tienen un desarrollo similar al que pueden alcanzar en condiciones ideales, en donde al parecer en este genotipo la contribución a la masa no depende de la vaina.

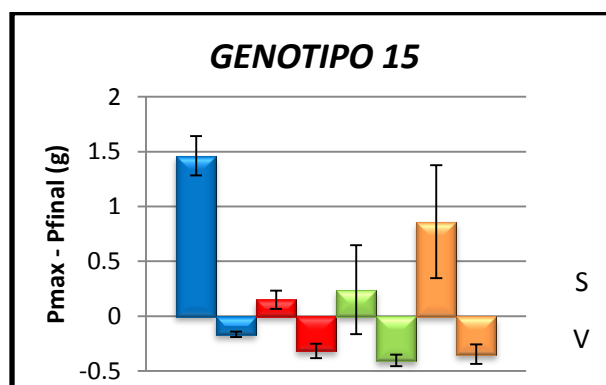


FIGURA 8. Diferencia de peso seco de vainas y semillas del Genotipo 15, durante el periodo que inicia a los veinte días después de la floración y termina cuando la semilla culmina su desarrollo bajo diferentes condiciones de crecimiento: Control (AZUL); Vainas removidas (ROJO); Plantas defoliadas (VERDE) y plantas en sequía (NARANJA). (n=5)

El siguiente paso fue investigar la generalidad del comportamiento mostrado en el genotipo 15. En la **Figura 9** se observan los resultados de otros genotipos sometidos a un análisis similar. Como se puede observar, la respuesta de los genotipos 42 y 40, se caracteriza porque las vainas pierden la misma cantidad de materia sin importar el tipo de estrés al que fueron sometidas. La ganancia en el peso de las semillas también es parecida en todos los casos y el peso final de las mismas representa aproximadamente la mitad del peso máximo que las semillas alcanzan en condiciones ideales.

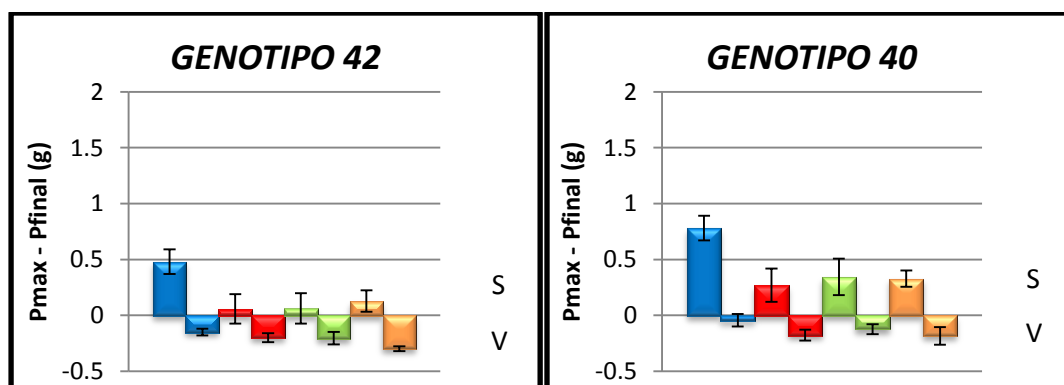


FIGURA 9. Diferencia de peso seco de vainas y semillas para diferentes genotipos, durante el periodo que inicia a los veinte días después de la floración y termina cuando la semilla culmina su desarrollo bajo diferentes condiciones de crecimiento: Control (AZUL); Vainas removidas (ROJO); Plantas defoliadas (VERDE) y plantas en sequía (NARANJA). Resultados de semillas (S), Resultados de vainas (V). (n=5)

La respuesta de los genotipos 22, 32, 17 y 26 (**Figuras 10 y 11**) se caracterizan porque no obstante que la disminución en el peso de las vainas es muy similar en las tres condiciones adversas, el peso de las semillas de plantas defoliadas y plantas expuestas a sequía es considerablemente mayor al que se obtuvo en los frutos removidos (en las primeras se alcanzó un peso que es mayor al 50% del observado en las plantas control, mientras que el peso de las semillas de vainas removidas apenas llegó al 25%).

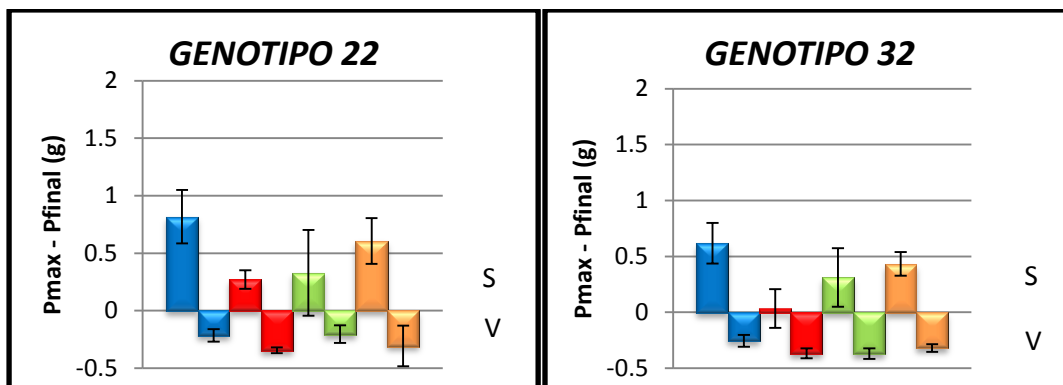


FIGURA 10. Diferencia de peso seco de vainas y semillas para diferentes genotipos, durante el periodo que inicia a los veinte días después de la floración y termina cuando la semilla culmina su desarrollo bajo diferentes condiciones de crecimiento: Control (AZUL); Vainas removidas (ROJO); Plantas defoliadas (VERDE) y plantas en sequía (NARANJA). Resultados de semillas (S), Resultados de vainas (V). (n=5)

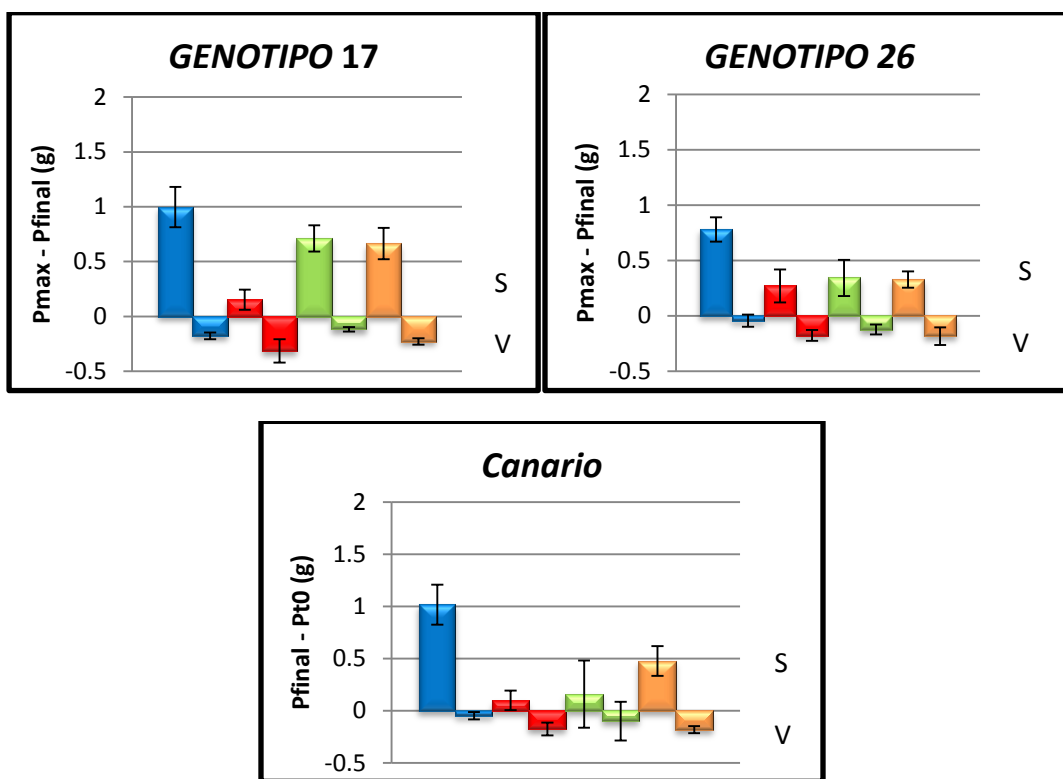


FIGURA 11. Diferencia de peso seco de vainas y semillas para diferentes genotipos, durante el periodo que inicia a los veinte días después de la floración y termina cuando la semilla culmina su desarrollo bajo diferentes condiciones de crecimiento: Control (AZUL); Vainas removidas (ROJO); Plantas defoliadas (VERDE) y plantas en sequía (NARANJA). Resultados de semillas (S), Resultados de vainas (V). (n=5)

Por último, el genotipo Canario (**Figura 11**), cuya respuesta se caracteriza porque las vainas pierden muy poco peso bajo las condiciones estresantes probadas, aunque de alguna manera parece ser capaz de favorecer el crecimiento de las semillas bajo sequía.

Los resultados descritos anteriormente, muestran que existen genotipos para los que, en condiciones de estrés, la removilización de los nutrientes acumulados en la vaina es muy importante para favorecer el desarrollo de la semilla.

Con el fin de estudiar más detalladamente este proceso, se decidió cuantificar los niveles de diferentes azúcares como glucosa, fructosa, sacarosa y almidón en las vainas. Se seleccionaron solo cuatro genotipos del grupo anterior, dos en los que en condiciones de estrés las semillas lograron un buen desarrollo y otros dos en los que bajo las mismas condiciones el proceso fue menos exitoso.

En la **Figura 12** se muestra que en condiciones ideales de crecimiento la cantidad de azúcares en el genotipo Canario no cambia, durante la etapa de los 20 a los 25 días, después de la floración. Pero cuando las vainas son removidas hay una disminución significativa en la cantidad de todos los azúcares medidos. En el genotipo 26 se aprecia una tendencia similar, sin embargo la degradación del almidón es menos eficiente (**Figura 13**).

En el caso del genotipo 22 no hay un cambio en la cantidad de azúcares ni siquiera en las vainas removidas (**FIGURA 14**), mientras que otros genotipos como el 15 muestran un aparente aumento en la cantidad de azúcares cuando las vainas fueron cortadas (**FIGURA 15**).

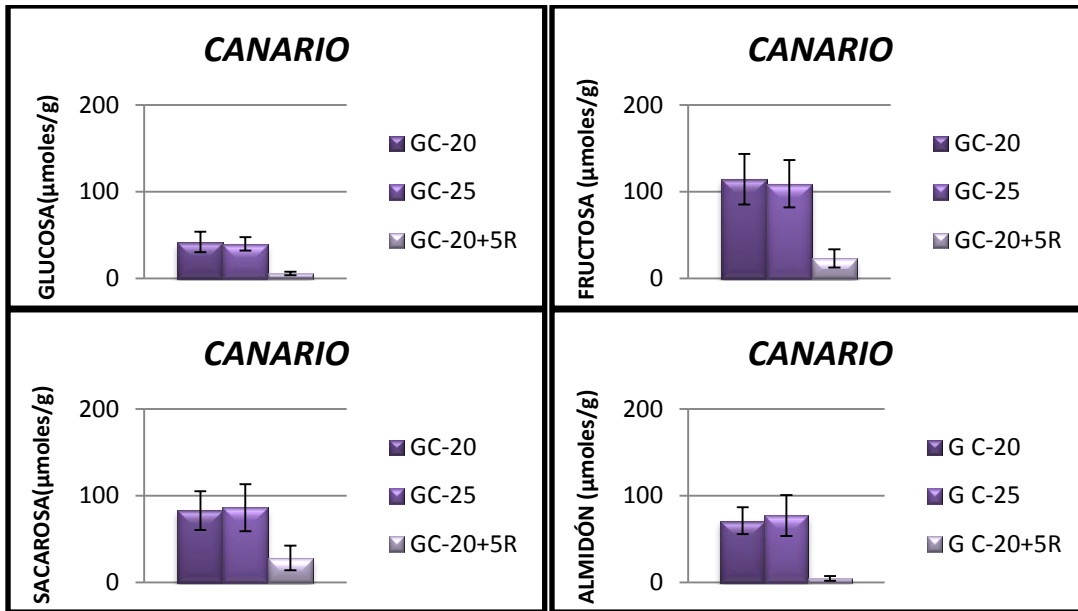


FIGURA 12. Cuantificación de azúcares en vainas del genotipo Canario en tres etapas diferentes del desarrollo de la planta. A los 20 y 25 días después de la floración (GC 20 Y 25), y en vainas que fueron removidas a los veinte días y analizadas cinco días más tarde (GC 20+5R).

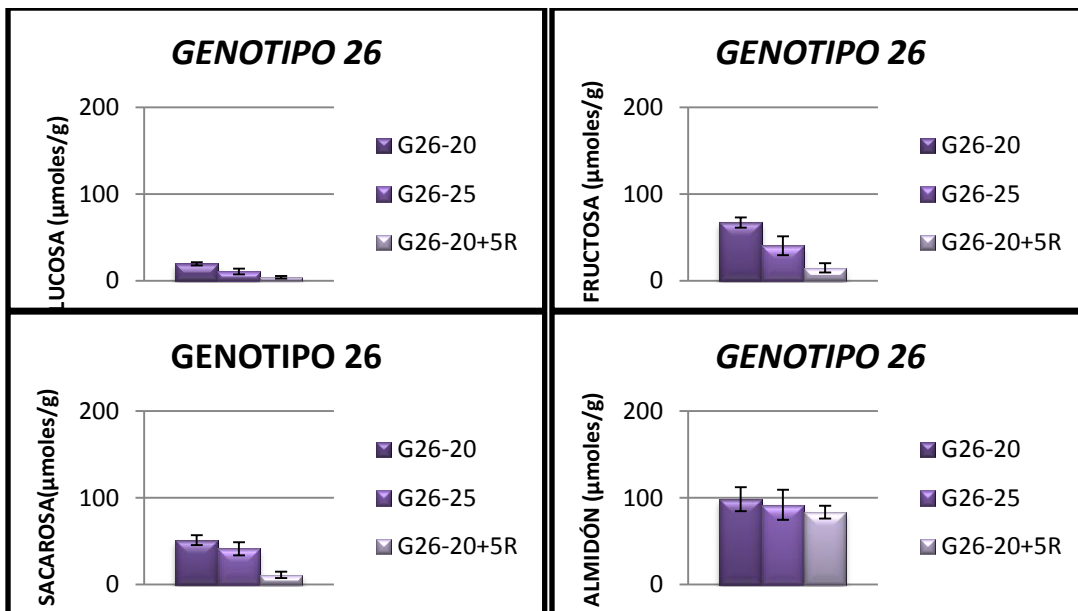


FIGURA 13. Cuantificación de azúcares en vainas del genotipo 26 en tres etapas diferentes del desarrollo de la planta. A los 20 y 25 días después de la floración (G26 20 Y 25), y en vainas que fueron removidas a los veinte días y analizadas cinco días más tarde (G26 20+5R).

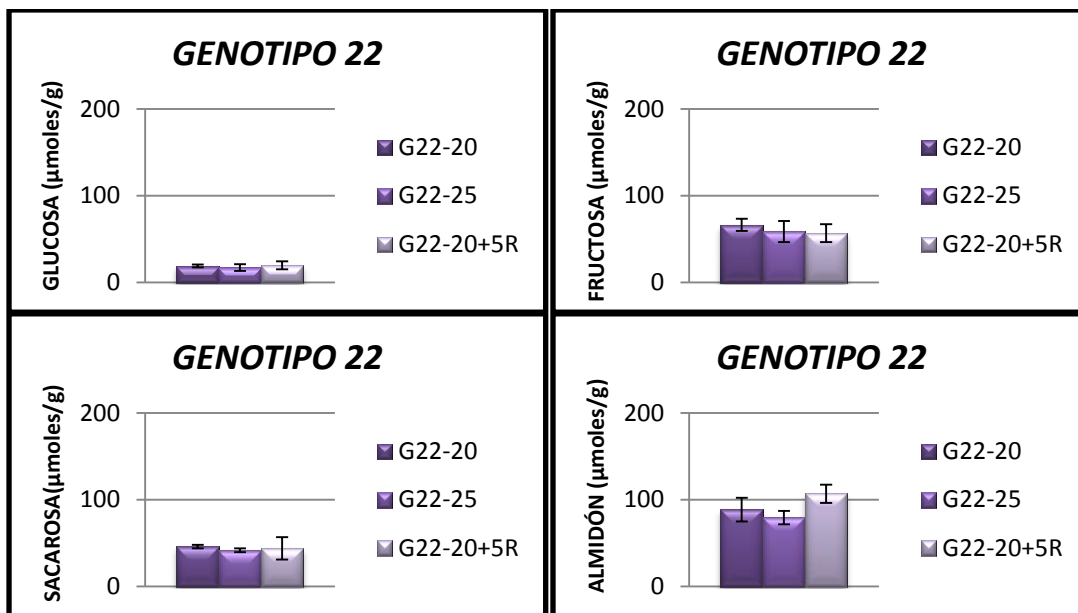


FIGURA 14. Cuantificación de azúcares en vainas del genotipo 22 en tres etapas diferentes del desarrollo de la planta. A los 20 y 25 días después de la floración (G22 20 Y 25), y en vainas que fueron removidas a los veinte días y analizadas cinco días más tarde (G22 20+5R).

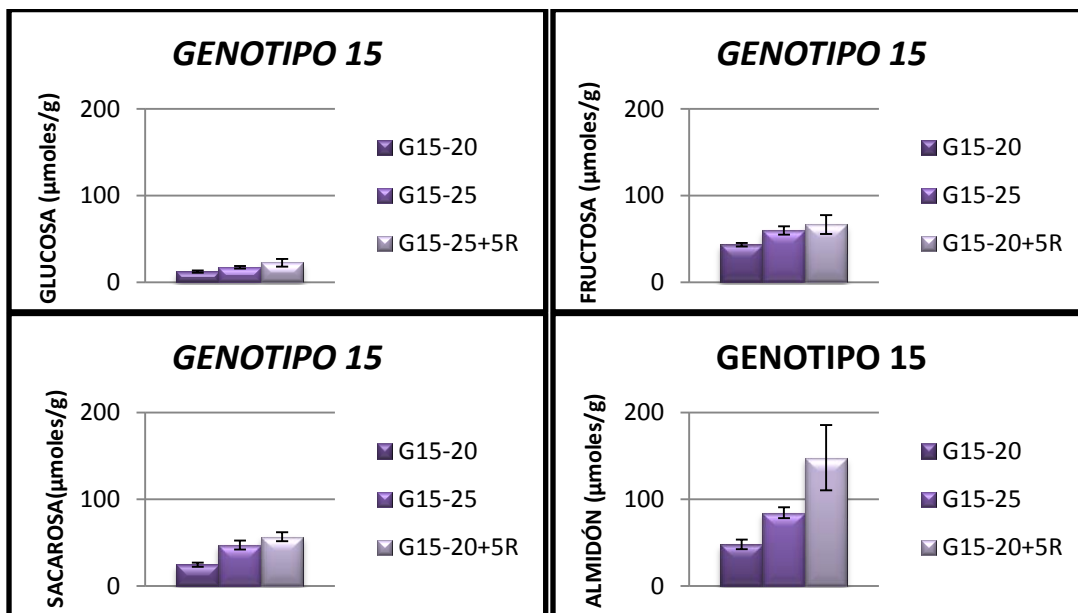


FIGURA 15. Cuantificación de azúcares en vainas del genotipo 15 en tres etapas diferentes del desarrollo de la planta. A los 20 y 25 días después de la floración (G15 20 Y 25), y en vainas que fueron removidas a los veinte días y analizadas cinco días más tarde (G15 20+5R).

Dada la efectividad del genotipo Canario para remover los azúcares acumulados en las vainas cuando los frutos son cortados de la planta, se decidió investigar el efecto de ese proceso sobre los niveles de los azúcares presentes en las semillas. En este caso solo se presentan los resultados de la medición de sacarosa, pues las cantidades de glucosa y fructosa fueron muy pequeñas y no se les pudo evaluar confiablemente. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 16**, en donde se observa que en condiciones normales la cantidad de sacarosa en las semillas disminuye de los 20 a los 22 días después de la floración, y posteriormente se estabiliza. En las semillas de los frutos removidos hay una disminución drástica de la cantidad de sacarosa al día siguiente de que fueron cortados de la planta y posteriormente los niveles son prácticamente los mismos que en el control.

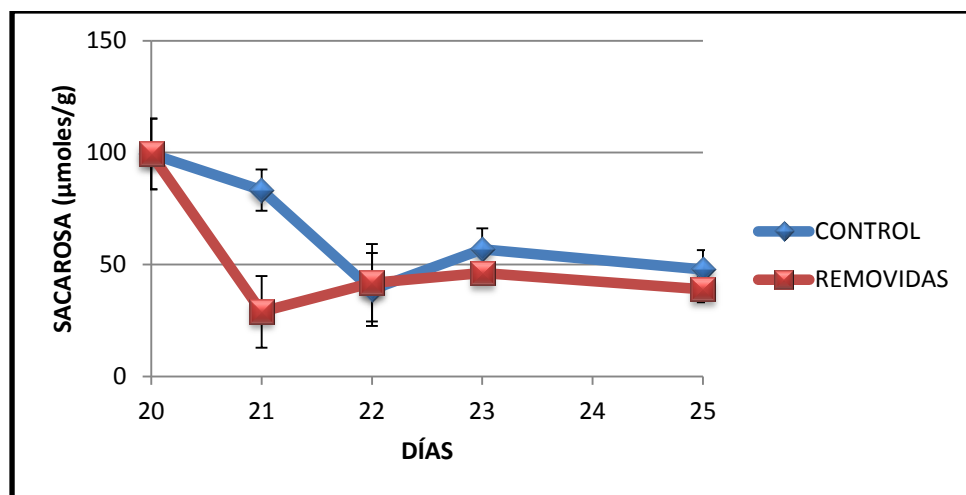


FIGURA 16. Cuantificación de sacarosa en semillas del genotipo Canario, en condiciones ideales (Control) y en aquellas que provienen de frutos removidos a 20 días después de la floración (Removidas).

La sacarosa es una molécula que utilizan muchas plantas para removilizar nutrientes de un órgano a otro, y que en la semilla promueve la acumulación de las sustancias de reserva. La sacarosa es sintetizada por la enzima sacarosa fosfato sintasa (SPS), y se consideró que medir su actividad tanto en vainas como en semillas era crucial para poder entender la respuesta de estos órganos cuando la plantas se someten a condiciones de estrés. Los resultados obtenidos muestran

que en las vainas removidas hay un prematuro aumento en la actividad de la enzima a los 2 días posteriores de que los frutos fueron cortados de la planta. En condiciones normales la actividad de la SPS en semillas se incrementa gradualmente durante todo el periodo estudiado. En las semillas que se desarrollaron en los frutos que fueron removidos la tendencia es similar. Si bien las diferencias no son significativas, los valores de la actividad de SPS fueron ligeramente superiores en las semillas de los frutos removidos (**FIGURA 17**).

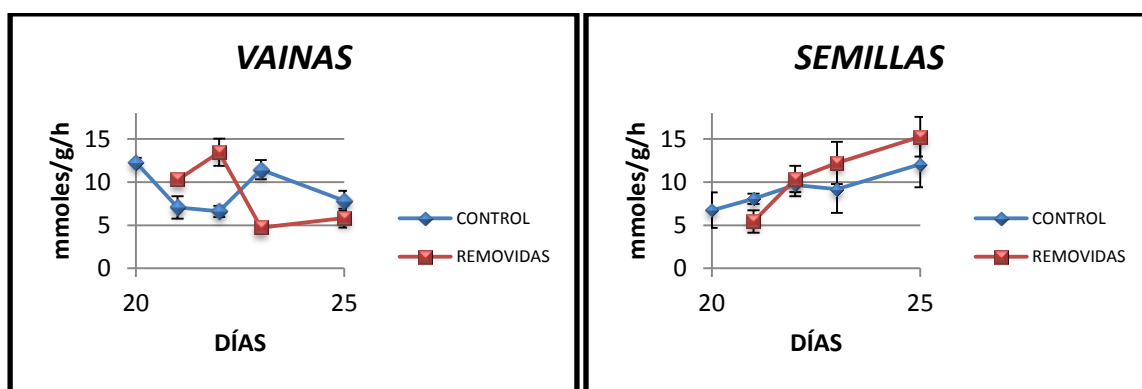


FIGURA 17. Actividad de sacarosa fosfato sintasa (SPS) en vainas y semillas de plantas cultivadas bajo condiciones ideales (control) y en frutos que fueron removidos de la planta a 20 días después de la floración.

DISCUSIÓN.

- **En condiciones ambientales adversas la removilización de nutrientes es una alternativa para favorecer la formación de la semilla.**

Las vainas que protegen a las semillas de frijol, también funcionan como amortiguadores de cambios en la disponibilidad de nutrientes. En condiciones normales, el desarrollo de las semillas depende de los nutrientes que la planta genera durante esa etapa y la contribución de las vainas es relativamente pequeña. Remover los frutos de la planta no es algo que ocurra en la naturaleza, pero es una forma efectiva de provocar que la formación de la semilla dependa de la cantidad de reservas acumuladas en la vaina y de la efectividad con que los productos de su degradación sean transportados. En cambio, defoliar las plantas o exponerlas a sequía terminal sí son ejemplos de condiciones ambientales adversas a las que con mucha frecuencia pueden estar expuestas las plantas (INEGI, 2007). En estos casos es muy posible que el desarrollo exitoso de las semillas dependa de los nutrientes que puedan recibir no solo de la vaina, sino también de otros órganos de la planta (Gregersen et al., 2013). Este trabajo parte de la suposición de que bajo condiciones ambientales extremadamente adversas el desarrollo de las semillas puede ser exitoso si sustancias de reserva acumuladas en diferentes órganos se canalizan al desarrollo de las semillas (Cuellar-Ortiz et al., 2008). En ese sentido, la caracterización de los procesos involucrados y la evaluación de la variabilidad genética disponible son actividades necesarias en la búsqueda de genotipos de frijol que pudieran ser exitosos bajo condiciones ambientales adversas.

Las **Figuras 5 a 11** muestran la validez de algunas de nuestras suposiciones: condiciones ambientales adversas reducen significativamente el peso seco de las vainas. Suponemos que los recursos obtenidos son usados para promover el desarrollo de las semillas. Nuestros resultados muestran que en los genotipos 40, 42, 22 y 32 los recursos obtenidos de la movilización de las reservas acumuladas

en las vainas son suficientes para que las semillas experimenten un desarrollo considerable, pero en el caso de los genotipos 15, 17, 26 y Canario no sucede así.

También se puede apreciar que en la mayoría de los genotipos el peso en las semillas producidas por las plantas que fueron defoliadas o expuestas a sequía, es considerablemente mayor que el de las semillas que se desarrollaron en los frutos que fueron removidos (Continuando con las mismas figuras). Estos resultados demuestran que si bien las reservas acumuladas en las vainas son importantes, hay otros órganos (la raíz, el tallo, las hojas, etc.) que también pueden tener una participación importante. Evaluar la contribución de cada uno de ellos es una actividad pendiente que deberá ser realizada en el futuro, aunque en estudios reportados anteriormente ya se ha analizado la importante contribución que tienen las hojas en la acumulación de nutrientes (Peoples y Dalling, 1988).

Nuestros resultados también muestran diferencias importantes en las respuestas de los genotipos a los distintos tipos de estrés. Algunos responden bien a defoliación y sequía (genotipos 22, 32, 17, 26 y Canario), otros lo hacen mejor solo en sequía (genotipo 15) y algunos más son incapaces de responder adecuadamente a los estímulos generados por esas condiciones (genotipos 40 y 42).

Una clasificación de los genotipos analizados en el estudio es la siguiente:

Grupo 1. Los genotipos que pertenecen a este grupo se caracterizan porque la aportación de la vaina no es suficiente para que las semillas tengan un desarrollo significativo. La defoliación tiene un efecto negativo muy importante sobre el peso de las semillas, sin embargo, en condiciones de sequía severa son capaces de lograr un desarrollo satisfactorio de las semillas. Dentro de este grupo solo se encuentra el genotipo 15.

Grupo 2. En este grupo están incluidos el genotipo 40 y 42, cuya respuesta se caracteriza porque en todos los casos la defoliación y remoción de la vaina lleva a un desarrollo de la semilla similar de poca acumulación de masa, lo que podría indicar que para estos genotipos el principal contribuyente de nutrientes para el desarrollo de la semilla bajo condiciones adversas es la vaina.

Grupo 3. Los genotipos de este grupo se caracterizan por su buena respuesta tanto en condiciones de sequía como en defoliación, ya que alcanzan desde un 50% hasta un 100% respecto al control, mientras que la vaina aporta aproximadamente la mitad del incremento en el peso de las semillas bajo esas condiciones. En este grupo están los genotipos 22 y 32, y si bien la vaina no es el principal contribuyente, sí es un órgano de importancia en la removilización de nutrientes.

Grupo 4. Por último agrupamos a los genotipos 17, 26 y Canario que tienen una respuesta similar al grupo anterior, con la diferencia de que en estos genotipos la aportación de la vaina no es significativa.

- **Los azúcares como medio de remoción de nutrientes de los órganos de la planta hacia la semilla.**

El análisis de la concentración de azúcares en las vainas permite clasificar en 2 grupos a los genotipos analizados. El primer grupo está formado por aquellos genotipos donde los niveles de todos los azúcares disminuyeron cuando los frutos fueron removidos. En el segundo grupo están los genotipos en donde los niveles se mantuvieron iguales sin importar que la planta haya sido expuesta a una condición de estrés.

En la primera clasificación se encuentran los genotipos Canario y 26 (**Figuras 12 y 13**, respectivamente). Sin embargo, previamente identificamos a estos genotipos como miembros de un grupo en el que la vaina no es un contribuyente importante para la formación de la semilla bajo condiciones ambientales adversas. Si bien el genotipo 26 es poco efectivo para degradar el almidón, este resultado muestra que la remoción efectiva de los azúcares acumulados en la vaina no necesariamente garantiza el desarrollo de las semillas bajo condiciones de estrés.

En el segundo grupo se encuentran los genotipos 22 y 15. Los cuales se caracterizar por una incapacidad evidente para remover azúcares. En algunos casos incluso pareciera que los niveles de los mismos se incrementan en las

vainas de los frutos removidos. Creemos que es poco probable que bajo esas condiciones pudiera sintetizarse almidón y que el aparente incremento es en realidad una consecuencia de la pérdida de agua que sufrieron las vainas de los frutos removidos (**Figuras 14 y 15**, respectivamente).

Sin embargo, en el genotipo 22 la contribución de la vaina es importante para la formación de las semillas bajo condiciones de estrés. El hecho de que esta propiedad no esté asociada a la removilización de los azúcares medidos sugiere que en este caso la importancia de la vaina está asociada a la removilización de otros azúcares o de proteínas (Staswick, 1989).

Otros materiales que podría enviar la vaina podrían ser componentes de la pared celular, se ha observado que de manera natural durante la maduración de las vainas polímeros de pectina ricos en galactosa se degradan (Stolle-Smits et al., 1999). Es posible que el proceso se acelere en condiciones de estrés y que parte de esos productos sean usados en la formación de semillas.

- **SPS, enzima reguladora de las cantidades de reservas en las semillas y posible participante en el fenómeno de removilización de nutrientes.**

En este proceso los niveles de sacarosa son muy importantes, en la vaina un aumento en la cantidad de sacarosa indicaría la formación de una especie que puede ser transportada (sin que ello implique descartar la importancia de otros azúcares que también pueden ser exportados). El incremento que se observa en la actividad de la SPS en las vainas poco tiempo después de que los frutos fueron removidos apoyaría esta sugerencia (**Figura 17**).

En las semillas la sacarosa cumple una función más compleja, no solo representa carbono que puede ser usado en la síntesis de sustancias de reserva, pues adicionalmente se le ha identificado como un promotor importante de los procesos que conducen a la acumulación de sustancias de reserva (Weber et al., 2005). De tal manera que para que la acumulación de las sustancias de reserva sea

eficiente, probablemente sea necesario mantener elevados los niveles de sacarosa. La determinación de la cantidad de sacarosa muestra que en el genotipo Canario, después del primer día posterior a que los frutos fueron removidos de la planta, los niveles son idénticos a los encontrados en semillas que se están desarrollando en condiciones normales (**Figura 16**). Sin embargo, la medición de la actividad de SPS (**Figura 17**), muestra que ésta es un poco más alta en las semillas que se desarrollaron en los frutos que fueron removidos, por lo que la diferencia respecto a las semillas que se desarrollaron en condiciones normales no es significativa y serán necesarios experimentos adicionales para establecer la importancia de estos cambios para promover el desarrollo de las semillas en condiciones ambientales adversas.

CONCLUSIONES.

- Bajo condiciones ambientales adversas, la removilización de nutrientes es una de las pocas alternativas con las que cuentan las plantas de frijol para lograr la formación de semillas con los recursos necesarios para germinar.
- En algunos genotipos la vaina proporciona la mayor parte de los recursos disponibles para la formación de las semillas bajo esas condiciones. En otros genotipos las contribuciones del resto de la planta pueden ser más importantes.
- La variabilidad genética de los materiales analizados es muy amplia: hay genotipos que responden bien a sequía pero no a los estímulos de la defoliación, otros son igualmente efectivos ante ambas condiciones adversas y algunos más que no responden adecuadamente a ninguna de las dos.
- La removilización efectiva de los azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa y almidón) que las vainas almacenan, no siempre es suficiente para soportar el desarrollo de semillas bajo condiciones ambientales adversas. En aquellos genotipos en donde la contribución de la vaina es muy importante, es necesario evaluar la removilización de proteínas.
- En vainas de frutos que fueron removidos, la actividad de sacarosa fosfato sintasa (SPS) podría estar involucrada en las síntesis de sacarosa y con ello en la exportación de nutrientes que son usados en la formación de las semillas. En semillas su contribución no es muy clara y para establecer su importancia son necesarios experimentos adicionales.

LITERATURA CITADA

1. Anderson Gustafson (1989) "Hypocholesterolemic affects of oat and vean products", Michigan Dry Bean Digest, 13, pp. 2-5.
2. ASERCA (Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria). 2012. Evolución de las importaciones de granos.
3. Audesirk T., Audersirk G., Byers B. E. (2001). Biología: la vida en la Tierra, Ed. Pearson Educación pp. 41
4. Ávila O. L., Moison M., Yoshimoto K., Masclaux D. C. (2014), Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling, Journal of Experimental Botany, Vol. 65, No. 14, pp. 3799–3811
5. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), (1986). Etapas de Desarrollo de la Planta de Frijol Común (*Phaseolus vulgaris* L.). Fernando Fernández de C., Paul Gepts, Marceliano López. Cali, Colombia. 34 p. ilustr.
6. Cuellar O. S.M., Arrieta M. M. P., Acosta G. J., Covarrubias A.A. (2008). Relation ship between carbohydrate partitioning and drought resistance in common bean. Plant Cell Environ. 31: 1399-1409.
7. Donald R.G., Wen J. S., Rose M. S. (1989), Carbon Partitioning among Leaves, Fruits, and Seeds during Development of *Phaseolus vulgaris* L., Plant Physiol. 91, 291-297
8. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations (n.d.) Manual de manejo poscosecha de granos a nivel rural. Departamento de agricultura. Obtenido el 2 de marzo de 2014.
<http://www.fao.org/docrep/x5027s/x5027S01.htm>
9. Flinn A.M., Pate J.S. (1968). Biochemical and physiological changes during maturation of fruit of the field pea (*Pisum arvense* L.). Ann. Bot. 32: 479-495
10. Flinn A.M. Pate J.S. (1970). A quantitative study of carbon transfer from pod and subtending leaf to the ripening seeds of the field pea (*Pisum arvense* L.). Journal of Experimental Botany. 21 (66): 71-82.
11. Fountain D.W., Outred H.A., Holdsworth J.M., Thomas R.G. (1989). Seed development in *Phaseolus vulgaris* L. Cv seminole. Plant Physiol. 89: 333-340.
12. García B. F.J., Roselló J. C., Santamarina S. P. (2006), Introducción al funcionamiento de las plantas, Valencia: Ed. Universidad Politécnica de Valencia pp. 27-28
13. Greisen P.L., Culetic A., Boschian L., Krupinska K. (2013). Plant Senescence and crop productivity. Plant Mol. Biol. 82: 603-622.
14. Hendrik W., McMichael R. W., Huber S. C. (1992), Identification of factors regulating the phosphorylation status of sucrose-phosphate synthase in vivo, Plant Physiol 99, 1435-1442
15. Hesse H., Sonnewld U., Willmitzer L. (1995) Cloning and expression analysis of sucrose-phosphate synthase from beet (*Beta vulgaris*). Mol. Gen. Genet. 247: 515-520.

16. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2007). El cultivo del frijol en Zacatecas, Censo Agropecuario 2007.
17. Jansson S., and Thomas H. (2008). Senescence: developmental program or timetable. *New Phytologist*. 179: 575-579.
18. Lara F. M., (2015). "El cultivo del frijol en México", *Revista digital universitaria*, Vol. 16, Núm. 2, ISSN 1607-6079.
19. Melkus G., Rolletschek H., Radchuk R., Fuchs J., Rutten T., Wobus U., Altmann T., Jakob P., Borisjuk L. (2009). The metabolic role of the legume endosperm: a non invasive imaging study. *Plant Physiol*. 151: 1139-1154.
20. Morley-Smith E.R., Pike M.J., Findlay K., Köckenberger W., Hill L.M., Smith A.M., Rawsthorne S. (2008). The transport of sugars to developing embryos is not via bulk endosperm in oilseed rape seeds. *Plant Physiol*. 147: 2121-2130.
21. Pate J. S., Flinn A. M. (1973). Carbon and Nitrogen Transfer from Vegetative Organs to Ripening Seeds of Field Pea (*Pisum arvense* L.), *Journal of Experimental Botany*, Vol. 24, No. 83, pp. 1090-1099
22. Pate J.S., Sharkey P.J. and Atkins A.K. (1977). Nutrition of a developing legume fruit. *Plant Physiol*. 59: 506-510
23. Patrick J.W., Offler C.E. (2001) Compartmentation of transport and transfer events in developin seeds. *J. Exp. Bot*. 52: 551-564.
24. Pechan P. A., Morgan D. G. (1985), Defoliation and its effects on pod and seed development in oil seed rape (*Brassica napus* L.), *Journal of Experimental Botany*, Vol. 36, No. 164, pp. 458-468
25. Peoples M.B., Dalling M.J. (1988). The interplay between proteolysis and amino acid metabolism during senescence and nitrogen relocation. In: Noodén L.D. and Leopold A.C. eds. *Senescence and Aging in Plants*. San Diego Academic Press, 181-217.
26. Peretó J., Sendra R., Pamblanco M., Bañó C. (1996) *Fundamentos de Bioquímica*, Ed. PUV pp. 273-274
27. Rosche E., Blackmore D., Tegeder M., Richardson, Schroeder H., Higgins T.J.V., Frommer W.B., Offler C.E., Patrick J.W. (2002). Seed-specific over expression of a potato sucrose transporter increases sucrose uptake and growth rates of developing pea cotyledons. *Plant J*. 30: 165-175.
28. Sabelli P.A., Larkins B.A. (2009). The development of endosperm in grasses. *Plant Physiol*. 149: 14-26.
29. Singh, S. P., H. Teran, C. G. Munoz and J. C. Takegami, "Two cycles of recurrent selection for seed yield in common bean", *Crop Science*, 1999, 39, pp. 391-397.
30. Staswick P. E. (1989). Preferential loss of an abundant storage protein from soybean pods during seed development, *Plant Physiol*. 90, 1252-1255
31. Stitt M., Wilke I., Fei P. R. and Hans W. H. (1988), Coarse control of sucrose-phosphate synthase in leaves: Alterations of the kinetic properties in response to the rate of photosynthesis and the accumulation of sucrose, *Planta* 174:217-230
32. Stolle-Smiths T., Beekhuizen J. G., Matthieu T.C. K., Pijnenburg M., Recourt K., Derksen J., Voragen A. G. (1999), Changes in Cell Wall Polysaccharides of Green Bean Pods during Development, *Plant Physiology*, Vol. 121, pp. 363-372
33. Thorne J. H., Ross M. R. (1983), An in vivo technique for the study of phloem unloading in seed coats of developing soybean seeds, *PlantPhysiol* 72,0268-0271

34. Thorne J.H. (1979) Assimilate redistribution from soybean pod walls during seed development. *Agron. J.* 71: 812-816.
35. Weber, H., Borisjuk L., Wobus U. (1996). Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: a role for seed coat-associated invertases and carbohydrate state. *Plant Journal* 10: 823-834.
36. Weber H., Borisjuk L., Wobus U. (2005). Molecular physiology of legume seed development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:253-279.
37. Zrenner R., Schuler K., Sonnewald U. (1996). Soluble acid invertase determines the hexose-to sucrose ratio in cold-stored potato tubers. *Planta* 198: 246-252.