

ASIGNACIÓN DE BIOMASA Y CARBOHIDRATOS EN SEMILLAS Y PLÁNTULAS DE *PHASEOLUS COCCINEUS* L. DOMESTICADO Y SILVESTRE

BIOMASS AND CARBOHYDRATE PARTITIONING IN SEEDS AND SEEDLINGS OF DOMESTICATED AND WILD *PHASEOLUS COCCINEUS* L.

MA. LUISA PATRICIA VARGAS-VÁZQUEZ¹, EBANDRO USCANGA-MORTERA^{1*}, DANIEL PADILLA-CHACÓN¹, HEIKE VIBRANS¹, JOSUÉ KOHASHI-SHIBATA¹, SALVADOR MIRANDA-COLÍN², PETRA YÁÑEZ-JIMÉNEZ¹

¹Posgrado en Botánica, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México.

²Posgrado en Genética, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México.

*Autor de correspondencia: euscanga@colpos.mx

Resumen

Antecedentes: La supervivencia de plantas depende de la germinación y la asignación de sustancias de reserva de la semilla a la plántula.

Preguntas y/o hipótesis: ¿La asignación de biomasa y concentración de sustancias de reserva en semillas y plántulas; enzimas y número de amiloplastos en cotiledones de *Phaseolus coccineus* se ha modificado por la domesticación?

Sitio y fechas de estudio: Los experimentos se efectuaron en cuarto oscuro y laboratorio del Posgrado en Botánica, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados en 2017 y 2018.

Métodos: Se determinaron la biomasa por método convencional y concentración de almidón, glucosa, fructosa y sacarosa por hidrólisis enzimática en embrión y plántulas de ayocote silvestres y domesticados. En cotiledones de semillas en germinación se cuantificaron los amiloplastos y se detectaron enzimas por medio de un gel nativo discontinuo de acrilamida con amilopectina de papa en una cámara de electroforesis.

Resultados: Las semillas y plántulas silvestres tuvieron menos biomasa en embrión (91 %), raíz (93 %) y vástago (87 %); pero mayor concentración ($\mu\text{mol g}^{-1}$) de almidón (53, 83 y 65 %, embrión, raíz y vástago, respectivamente), glucosa (74, 73 y 3 %), fructosa (94, 93 y 29 %) y sacarosa (84, 88 y 30 %) que las domesticadas. Se observaron endoamilasas, enzimas desramificadoras y β -amilasas. Los domesticados tuvieron menos amiloplastos que los silvestres.

Conclusiones: El metabolismo de la biomasa, sustancias de reserva, las enzimas y el número de amiloplastos en los cotiledones y plántulas indicaron patrones diferentes en las vías metabólicas resultado de la domesticación.

Palabras clave: Asignación de biomasa de la semilla a la plántula, Domesticación y diversificación, Enzimas degradadoras del almidón de reserva, Germinación, *Phaseolus coccineus* L.

Abstract

Background: Survival of plant depends on germination and the allocation of reserve substances from the seed to the seedling.

Question/hypothesis: Have biomass partitioning and reserve substances concentration in seeds and seedlings; enzymes and amyloplast number in cotyledons of *Phaseolus coccineus* been modified by the domestication process?

Study site and years of study: The experiments were carried out in the dark room and the laboratory of the Botany Department, Campus Montecillo, Postgraduate College in 2017 and 2018.

Methods: The biomass was determined by the conventional method and the concentration of starch, glucose, fructose and sucrose by enzymatic hydrolysis in embryos and seedlings of wild and domesticated runner beans. In germinated seeds cotyledons, the number of amyloplasts was quantified and the presence of enzymes was detected by means of a discontinuous native acrylamide gel with potato amylopectin in an electrophoresis chamber.

Results: The wild *P. coccineus* seed and seedlings had less biomass in the embryo (91 %), root (93 %) and shoot (87 %), but higher concentration ($\mu\text{mol g}^{-1}$) of starch (53, 83, 65 %, embryo, root and shoot, respectively), glucose (74, 73 and 3 %), fructose (94, 93 and 29 %) and sucrose (84, 88 and 30 %) than the domesticated ones. Endoamylases, de-branching enzymes and β amylases were observed. Domesticated runner beans had lesser amyloplasts than the wild runner beans.

Conclusions: The biomass, reserve substances metabolism, the enzymes and the number of amyloplasts in cotyledons and seedlings indicate different pattern in the metabolic pathway resulting from the domestication process.

Keywords: Biomass allocation from seed to the seedling, Degrading enzymes of reserve starch, Domestication and diversification, Germination, *Phaseolus coccineus* L.

La domesticación, proceso de la modificación de las plantas cultivadas por la selección humana (Harlan 1992), generalmente se estudia a través de la morfología y la genética. Sin embargo, el metabolismo también se modifica bajo selección (Beleggia et al. 2016), especialmente los elementos más importantes, como son los de captación y movilización de energía (Beleggia et al. 2016, Noda-García et al. 2018). Los carbohidratos, principales reservas de energía, no solo participan en el metabolismo celular, además son estructurales porque conforman la pared celular. Se clasifican en solubles (mono, di y oligosacáridos) y no solubles (polisacáridos) como el almidón, celulosa y pectina (Bjergegaard et al. 2001).

La eficiencia de conversión de los carbohidratos de reserva dependerá del tipo, cantidad y actividad de las enzimas presentes (Bewley et al. 2013). Además, la utilización de dichas reservas está relacionada con el contenido de glúcidos (Cheng et al. 2015). La movilización de sustancias de reserva de la semilla y su eficiencia de conversión en el eje embrional es importante para formar plantas vigorosas (Cheng et al. 2013). Asimismo, Nik et al. (2011) indicaron que, el crecimiento de la plántula es afectado por la proporción de reservas de la semilla que se moviliza a sus tejidos, y su continua eficiencia de conversión. La cantidad de reservas está relacionada con el tamaño de la semilla y éste está relacionado con la domesticación. Las plantas domesticadas tienen semillas más grandes con respecto a sus parientes silvestres. Sin embargo, las semillas más grandes no necesariamente son las más eficientes en la conversión de las reservas, esto depende de la especie (Milla & Matesanz 2017). Por ejemplo, en nueve especies de *Quercus*, bellotas grandes y pequeñas asignaron la misma proporción de reservas de los cotiledones a las plántulas (Yi et al. 2015).

Phaseolus coccineus L. (Fabaceae; runner bean en inglés y ayocote en el español de México) es una planta domesticada desde hace 2,200 años aproximadamente (Kaplan 1965) en Mesoamérica. En el centro de México conviven poblaciones silvestres y domesticadas y se ha documentado el flujo genético en esta especie alógama (Miranda-Colín 1979, Escalante et al. 1994). Los compuestos almacenados en los cotiledones de la semilla de *Phaseolus coccineus* son principalmente carbohidratos (40 %) y proteínas (25 %); el resto lo constituyen sustancias minerales y lípidos (Urrialde de Andrés 1992). Dentro de los carbohidratos, la sacarosa es el azúcar predominante y la estaquiosa es el oligosacárido principal (Alvarado-López et al. 2019). *Phaseolus coccineus* es un buen modelo para estudiar cómo la domesticación ha modificado la biomasa, los glúcidos y las enzimas en la semilla, y su eficiencia de asignación al eje embrional para su establecimiento como una planta vigorosa, debido a que se cuenta con poblaciones que se han sometido a presión de selección alta

(mejoramiento genético), presiones de selección intermedia (selección por agricultores) y selección baja (selección natural).

Son escasas las referencias que han tratado la asignación de recursos en plántulas y en forma comparativa entre materiales domesticados y silvestres. No se encontraron referencias que examinen la concentración relativa de los diferentes azúcares en semillas domesticadas y silvestres. Estudios acerca de si existen cambios en el metabolismo de degradación de almidones debidos al proceso de domesticación en leguminosas, son necesarios (Tayade et al. 2019). Determinar la degradación del almidón a azúcares solubles y su asignación a la plántula en materiales domesticados y silvestres, permitirá saber si ocurrieron cambios en el metabolismo de estas sustancias de reserva durante el proceso de domesticación y diversificación de *Phaseolus coccineus*. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue determinar los cambios en la biomasa y carbohidratos en semillas de *Phaseolus coccineus*, domesticado y silvestre y su asignación a la plántula en condiciones de oscuridad que eviten la interferencia de la fotosíntesis.

Materiales y métodos

Material vegetal. Consistió en una variedad mejorada, tres variedades nativas (una de testa color blanco con semillas grandes y dos de testa de colores oscuros de diferentes tamaños), y dos formas silvestres de *Phaseolus coccineus* L. colectadas en México en 2016 (Figura 1 y Tabla 1).

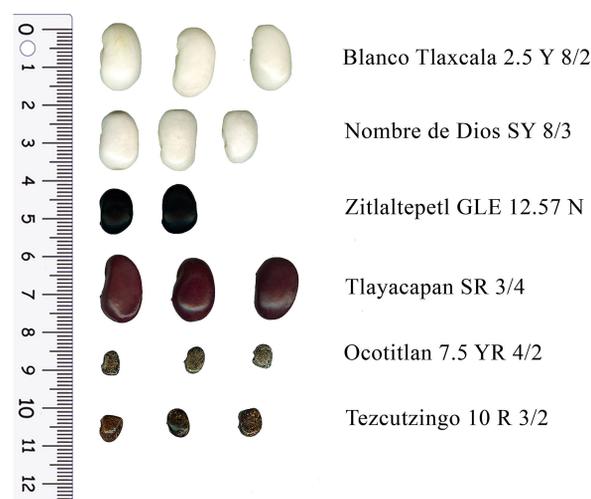


Figura 1. Características de las semillas de variedad mejorada (Blanco Tlaxcala), nativas (Nombre de Dios, Zitlaltepelt y Tlayacapan) y formas silvestres (Ocotitlán y Tezcutzingo) de *Phaseolus coccineus*. Los símbolos después del nombre son la clasificación del color de la testa de acuerdo a la clasificación de Munsell (2011).

Tabla 1. Formas de *Phaseolus coccineus*, y sitios de colecta: coordenadas geográficas y altitud. Se emplean los nombres de las localidades para referirse a los materiales. m snm = Metros sobre el nivel del mar

Formas	Sitio de Colecta	Coordenadas Geográficas		Elevación
		Latitud N	Longitud O	m snm
Variedad Mejorada	Blanco Tlaxcala, Edo. de México	19° 26'	-98° 54'	2,250
Variedades Nativas	Nombre de Dios, Dgo.	24° 46'	-104° 05'	2,115
	Zitlaltepétl, Tlax.	19° 12'	-97° 54'	2,540
	Tlayacapan, Mor.	18° 57'	-98° 59'	1,630
Silvestres	Ocotitlán, Mor.	19° 01'	-99° 06'	2,060
	Tezcutzingo, Edo. de Méx.	19° 29'	-98° 49'	2,580

De las dos formas silvestres, el material del Tezcutzingo derivaba de una población con posibilidades de infiltración genética con cultivos de la misma especie y tenía semillas visiblemente más grandes; el material de Ocotitlán provenía de una población más aislada. De las variedades con testa color blanco, una era mejorada y la otra nativa; generalmente, se consideran con mayor grado de domesticación a las semillas con testas más claras (Fuller & Allaby 2009). Por lo que los materiales representan un gradiente de domesticación.

Para obtener semilla recién cosechada, las colectas se sembraron en macetas de 5 kg de capacidad, aisladas espacialmente (6 km) para evitar el entrecruzamiento entre colectas. La semilla sobrante se está conservando en la colección de trabajo del Programa de Botánica del Colegio de Postgraduados en Montecillos, México.

Preparación de muestras. Se utilizaron seis lotes de 35 semillas cada uno para determinar: 1) biomasa en embrión, 2) concentración de almidón, glucosa, fructosa y sacarosa en embrión; 3) número de amiloplastos en cotiledón, 4) biomasa en raíz, vástago y cotiledón remanente; 5) concentración de almidón, glucosa, fructosa y sacarosa en raíz y vástago de plántulas desarrolladas en oscuridad; y 6) enzimas que degradan el almidón.

Biomasa de embrión. Se hidrataron 10 semillas por colecta durante 24 h a 25 °C para facilitar la separación del embrión de la testa. Las semillas se colocaron entre dos capas de papel filtro (Alstrom Núm. 541) humedecidos con 10 mL de agua destilada dentro de cajas Petri de 9 cm de diámetro. Posterior a la eliminación de la testa, cada uno de los embriones se secaron por separado en una estufa de secado marca Blue modelo M por 72 h a 75 °C y se pesaron en una balanza analítica Sciencetech modelo SA 120 (± 0.001 g).

Concentración de almidón, glucosa, fructosa y sacarosa en embrión. Los embriones individuales de cada colecta se pesaron, y se maceraron uno por uno, con agua destilada y etanol al 80 %. Se calentaron a 80 °C durante 40 min en

baño María. La muestra se separó en: fase líquida, utilizada para la medición de glucosa, fructosa y sacarosa, y en fase sólida (50 mg), para la determinación de almidón. La fase sólida se colocó en baño María a 90 °C por cuatro h, se enfrió a temperatura ambiente, se secó a 60 °C por 12 h y se maceró. El contenido de almidón se determinó con el método de hidrólisis enzimática. Incluyó la despolimerización mediante la hidrólisis al sobrecalentar el almidón y la acción de las enzimas β -glucosidasa (10 U), α -amilasa (1 U) y acetato de sodio, marca Sigma Aldrich.

La concentración de glucosa, fructosa y sacarosa fue evaluada por el método enzimático propuesto por Viola & Davies (1992). Se determinaron los glúcidos a través de la adición secuencial de las enzimas hexoquinasa (0.3U/10 μ L), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, 0.3U/10 μ L), fosfoglucosa-isomerasa (PGI, 0.3U/10 μ L) e invertasa (0.3U/10 μ L). En una microplaca con 96 pocillos se añadieron 5 μ L de extracto etanólico, 155 μ L de muestra de reacción y 10 μ L de cada una de las enzimas. Se sometió a un periodo de incubación de 30 min a 37 °C, en la adición de la G6PDH y la PGI, y 45 min a 30 °C en la adición de la invertasa. La absorbancia fue medida con un espectrómetro de microplacas (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific Inc. EE.UU.) a una longitud de onda de 340 nm. Se calcularon las concentraciones utilizando una curva estándar de glucosa a 5 mM, con una $R^2 = 0.97$.

Número de amiloplastos en el cotiledón. Cuatro semillas de cada ayocote se desinfectaron y escarificaron con un escalpelo en el lado opuesto al hilum, se colocaron en cajas Petri con discos de papel filtro y se humedecieron con agua destilada a temperatura constante de 25 °C. Una vez que la radícula emergió a través de la testa, en cada semilla se hicieron cuatro cortes histológicos en la parte media del cotiledón. Dichos cortes se fijaron en FAA, se deshidrataron gradualmente en alcoholes, se incluyeron e infiltraron en parafina en un cambiador automático de tejidos marca TISSUE-TEK II y se hicieron cortes con un micrótopo rotatorio marca ERMA INC. a 10 micras y se tiñeron con ácido peryódico y reactivo de Schiff (Johansen 1940). El

número de los amiloplastos (granos de almidón) se determinó en campos de 40x en un microscopio Zeiss, modelo Axioscope 2, y se transformó a número de amiloplastos por mm². Se obtuvieron imágenes con una cámara digital Amscope y el programa Image J.

Detección de enzimas degradadoras de almidón. En cotiledones de semillas escarificadas y en germinación se detectó la presencia de enzimas en cada colecta. Para ello se utilizó un gel nativo discontinuo de acrilamida con amilopectina de papa en una cámara de electroforesis Bio Rad.

El contenido del gel separador fue: 1.25 mL de acrilamida: bisacrilamida 30:08, 6.25 µL de amortiguador pH 8.8 (3M), 10 mg de amilopectina de papa en 500 µL de agua destilada, 2 µL de CaCl₂ (100 mM), 5 µL de MgCl₂ (100 mM), 2.625 mL de agua destilada, 5 µL de TEMED, y persulfato de amonio al 10 por ciento. El contenido del gel apilador fue: 310 µL de bis-acrilamida: bisacrilamida 30:08, 620 µL de amortiguador TRIS a concentración de 0.5M, 1.52 mL de agua destilada, 5 µL de TEMED, 30 µL de persulfato de amonio al 10 % preparado con 30 mg de persulfato en 300 µL de agua destilada.

La separación de enzimas se hizo con 20 mg del cotiledón de semillas escarificadas y embebidas por 24 h a 25 °C, condiciones que permitieron homogeneizar el tiempo de germinación de las semillas. Las muestras se colocaron en tubos Eppendorf con 50 mL de amortiguador de extracción: 2.5 mL de acetato de sodio a concentración de 0.5 M y pH 5.5, 275 µL de CaCl₂ a concentración de 100 mM, 275 µL de MgCl₂ a concentración de 100 mM, 2.5 mL de etilenglicol, 25 µL de DTT (1 mM), 19.425 mL de agua destilada, y 50 µL de inhibidores de proteasa en 5 mL de agua destilada (concentración del 1 %).

Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min y el sobrenadante se colocó en tubos Eppendorf con 20 µL del amortiguador de carga (1/3 del volumen del extracto) y 5 µL de cada muestra. La fuente de poder se ajustó a 50 Voltios durante 4 h. El contenido del amortiguador de incubación fue: 5 mL de acetato de sodio, pH 5.5 a una concentración de 50 M, 500 µL de CaCl₂ a 1 mM, 500 µL de MgCl₂ a 1 mM, y 44 mL de agua destilada.

El gel se tiñó con una solución de lugol de 20 % de KI y 10 % de I. Con esta tinción, los productos de la hidrólisis de la amilopectina y su electroforesis se tiñen de diferentes colores: las endoamilasas crean bandas incoloras, las β-amilasas bandas de color marrón más claro, y la acción de las enzimas desramificadoras crean bandas de color azul pálido (Kafekuda & Duke 1984).

Biomasa en raíz, vástago y cotiledón remanente. Dos lotes de 15 semillas de cada colecta con pesos uniformes se escarificaron y colocaron en cajas Petri en una germinadora

ESCO Isotherm a 20 °C hasta que emergió la radícula a través de la testa. Se trasplantaron a bolsas para cultivo de 15 × 25 cm con fuelle color negra calibre 500 (1 kg de capacidad) con vermiculita como sustrato y se mantuvieron en oscuridad a 22 ± 2 °C y 72 ± 1 % de humedad relativa hasta el inicio de marchitamiento del ápice del vástago, considerado como el fin de movilización de reservas de los cotiledones a la plántula. Una vez alcanzado este punto las plántulas de un lote se separaron en raíz, vástago y cotiledón remanente, se determinó su peso fresco y seco en una balanza analítica (± 0.001 g). El secado del material se realizó en un estufa de secado a 72 h a 70 °C.

Concentración de almidón, glucosa, fructosa y sacarosa en raíz y vástago. Un grupo de cuatro plántulas fue separado en vástago, raíz y el remanente de los cotiledones. A cada órgano se le aplicó el procedimiento descrito en el caso del embrión, excepto en el remanente de los cotiledones. Las variables registradas fueron biomasa o peso seco del embrión, peso seco de raíz, vástago y remanente de cotiledones de la plántula (en g), concentración de almidón, glucosa, fructosa y sacarosa en embrión, raíz y vástago (en µmoles g⁻¹ de peso seco), número de amiloplastos por mm² en tejido de cotiledón e identificación de enzimas en la degradación del almidón.

Diseño experimental y análisis estadístico. Los tratamientos fueron: una variedad mejorada (Blanco Tlaxcala), tres variedades nativas (Nombre de Dios, Tlayacapan, Zitlaltepec, y dos colectas silvestres (Tetzcutzingo y Ocotitlán), lo que equivale a seis tratamientos; se distribuyeron en un diseño completamente al azar. La unidad experimental estuvo representada por cada una de las semillas o plántulas. Se verificó la independencia, normalidad y homogeneidad de varianza de los datos. Cuando no se cumplieron estos supuestos fueron transformados a logaritmo y/o raíz cuadrada. Posteriormente se sometieron a ANDEVAS y pruebas de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$). Asimismo, se hicieron ANDEVAS y comparación de medias de domesticados *versus* silvestres. Todos los análisis se hicieron con el paquete estadístico SAS (SAS 2012).

Resultados

Biomasa del embrión. El embrión de semillas de ayocotes domesticados tuvo 11 veces más biomasa en promedio que el embrión de los ayocotes silvestres (0.803 vs. 0.073 g). Los ayocotes domesticados, Nombre de Dios y Zitlaltepetl, presentaron pesos mayores de embrión con respecto a Blanco Tlaxcala y Tlayacapan. En los ayocotes silvestres, el peso seco del embrión de Tetzcutzingo fue significativamente mayor que el de Ocotitlán (Figura 2).

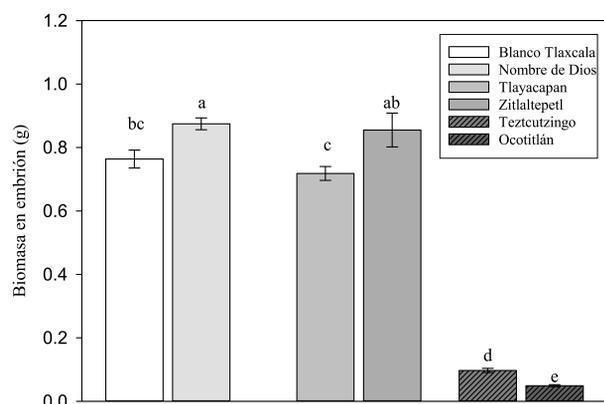


Figura 2. Biomasa del embrión de las variedades mejorada (Blanco Tlaxcala) y nativas (Nombre de Dios, Zitlaltepetl y Tlayacapan), y las formas silvestres (Tezcutzingo y Ocotitlán) de *Phaseolus coccineus*. Cada barra es el promedio de ocho repeticiones. Letras diferentes arriba de las barras indican diferencia estadística significativa (Tukey <math>< 0.05</math>).

Concentración de almidón, glucosa, fructosa y sacarosa en el embrión. Las concentraciones de almidón, glucosa, fructosa y sacarosa en los ayocotes silvestres fueron estadísticamente mayores que en los domesticados (Tabla 2). Se expresaron en $\mu\text{moles g}^{-1}$ de peso seco que refleja el número de moléculas. Por lo tanto, los silvestres con semillas más pequeñas tuvieron más moléculas de azúcar por gramo que los domesticados. La diferencia en promedio entre las dos formas fue significativa ($p < 0.0001$) (Tabla 2).

Entre los ayocotes silvestres no se observó diferencia significativa en la concentración de almidón, glucosa, fructosa y sacarosa. En los ayocotes domesticados, la concentración de almidón fue similar. En los azúcares solubles no se observó una tendencia. La concentración de glucosa fue menor en Zitlaltepec, la concentración de fructosa fue mayor en Tlayacapan, y la concentración de sacarosa fue menor en Blanco Tlaxcala con respecto a las otras variedades (Tabla 2).

Número relativo de amiloplastos en el cotiledón. Se observaron diferencias sustanciales y significativas en el número relativo de amiloplastos por unidad de superficie en los cotiledones de los ayocotes. En tendencia, los domesticados tuvieron 426 menos amiloplastos mm^{-2} que los silvestres. Entre los ayocotes domesticados, la variedad mejorada Blanco Tlaxcala y la nativa Nombre de Dios, mostraron 90 % más amiloplastos que las variedades Tlayacapan y Zitlaltepetl (Tabla 3).

Enzimas degradadoras de almidón en cotiledones. Se observaron diferencias en las diferentes enzimas relacionadas con la degradación de almidón (Figura 3). Todos los materiales tenían endoamilasas (bandas apenas perceptibles en la parte superior del gel, con migración mínima). Igualmente, compartieron β -amilasas (bandas de color marrón más claro); hubo un patrón similar en los materiales domesticados blancos y en los dos silvestres, mientras los ayocotes oscuros mostraron mayor diversidad de estas enzimas. Todos los ayocotes, excepto la variedad mejorada Blanco Tlaxcala, tenían presencia observable de

Tabla 2. Concentración de almidón, glucosa, fructosa y sacarosa en el embrión de las variedades mejorada (Blanco Tlaxcala) y nativas (Nombre de Dios, Zitlaltepetl y Tlayacapan), y las formas silvestres (Tezcutzingo y Ocotitlán) de *Phaseolus coccineus*, en semillas embebidas durante 24 h.

Forma	Ayocote	Almidón	Glucosa	Fructosa	Sacarosa
$\mu\text{m g}^{-1}$ de peso seco					
Domesticada	Blanco Tlaxcala	83.63 c	1.93 c	0.29 c	2.71 b
	Nombre de Dios	113.89 bc	1.35 c	0.42 bc	3.95 c
	Tlayacapan	81.08 c	2.58 bc	0.57 b	5.38 bc
	Zitlaltepetl	76.94 c	0.559 d	0.29 c	4.88 bc
Silvestre	Tezcutzingo	174.74 ab	4.49 ab	3.48 a	18.63 a
	Ocotitlán	200.88 a	7.94 a	3.65 a	25.49 a
Domesticada	Promedio	87.9 b	1.60 b	0.34 b	5.61 b
Silvestre	Promedio	189.0 a	6.21 a	3.57 a	22.37 a

Los valores son la media de cuatro repeticiones de cada material (16 para los domesticados y 8 para los silvestres). Letras diferentes en las columnas indican diferencia significativa (Tukey <math>< 0.05</math>).

enzimas desramificadoras (color azul pálido, con poca migración).

Tabla 3. Número relativo de amiloplastos en el tejido de los cotiledones de las variedades mejorada (Blanco Tlaxcala) y nativas (Nombre de Dios, Zitlaltepetl y Tlayacapan), y las formas silvestres (Tezcutzingo y Ocotitlán) de *Phaseolus coccineus*.

Forma	Ayocote	Número de amiloplastos mm ²
Domesticada	Blanco Tlaxcala	846 ± 242 ab
	Nombre de Dios	544 ± 294 bc
	Tlayacapan	375 ± 80 c
	Zitlaltepetl	353 ± 55 c
Silvestre	Tezcutzingo	779 ± 58 ab
	Ocotitlán	1132 ± 194 a

Cada dato es el promedio de cuatro repeticiones

Fin de movilización de reservas del embrión a la plántula.

Todos los materiales terminaron la movilización de reservas tres o cuatro semanas después de la siembra: Blanco Tlaxcala 29 días después de la siembra (dds); Nombre de Dios, 23.4 dds; Tlayacapan, 27 dds; Zitlaltepetl, 23 dds; Tezcutzingo, 23 dds; Ocotitlán, 21 dds. No se observaron diferencias significativas.

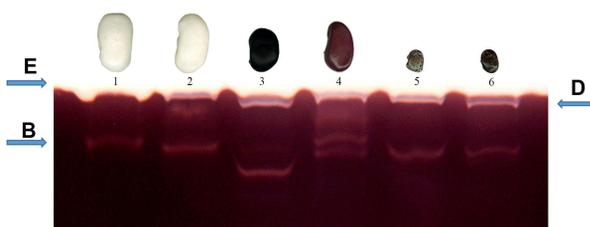


Figura 3. Enzimas degradadoras de almidón en cotiledones de las variedades mejorada (Blanco Tlaxcala (2)) y nativas (Nombre de Dios (1), Zitlaltepetl (3) y Tlayacapan (4)), y las formas silvestres (Tezcutzingo (6) y Ocotitlán (5)) de *Phaseolus coccineus* después de 24 h en imbibición, en gel de acrilamida con amilopeptina de papa, teñido con lugol. E = endoamilasa, B = β-amilasas y D = enzima desramificadora del almidón.

Biomasa en raíz, vástago y cotiledón remanente en la plántula.

Los ayocotes domesticados tuvieron 14 veces más biomasa en raíz, ocho veces más en vástago y siete veces más en el remanente de los cotiledones en comparación con los silvestres (Tabla 4). Entre los domesticados, la biomasa de la raíz de Tlayacapan y Zitlatelpec fue 35 % mayor con respecto a la de las otras variedades. En la biomasa del vástago y el remanente de cotiledón no se observó diferencia.

Entre las formas silvestres el peso del vástago y la raíz de Tezcutzingo fueron mayores que el de Ocotitlán; en el remanente del cotiledón no se observó diferencia (Tabla 4).

El porcentaje de biomasa asignado a la raíz fue igual entre los ayocotes domesticados, pero diferente al asignado en los ayocotes silvestres. No se observó diferencia en el porcentaje de asignación de biomasa al vástago ni en el porcentaje del remanente en el cotiledón entre domesticados y silvestres.

Concentración de almidón, glucosa, fructosa y sacarosa en raíz y vástago. La concentración por gramo de biomasa de almidón, glucosa, fructosa y sacarosa (medida en μmoles por g de peso seco) fue 6, 4, 14 y 8 veces mayor, respectivamente, en la raíz de las plántulas silvestres que en las domesticadas; en los vástagos no se observó esta diferencia (Tabla 5). En los ayocotes domesticados, destacan Blanco Tlaxcala y Nombre de Dios con la baja concentración de almidón, glucosa, fructosa y sacarosa en raíz y vástago. Los ayocotes silvestres mostraron diferencias en el contenido de almidón tanto en raíz como en vástago (Tablas 5 y 6).

Discusión

Biomasa de embrión. La biomasa del embrión en los ayocotes domesticados y silvestres se encuentran en los intervalos señalados para el peso de las semillas por Debouck (1994) y Vargas-Vázquez et al. (2014), tomando en cuenta que se pesaron sin testa. Se confirmó la observación de Chacón-Sánchez (2018) que el ayocote domesticado aumentó el tamaño de su semilla, comparado con las poblaciones silvestres, y comparado con otras especies de *Phaseolus* (*P. coccineus*: 5 a 6 veces más que los silvestres, *P. vulgaris* L. 4 a 6 veces, *P. acutifolius* de 3 a 6 veces, *P. dumosus* de 2 a 3 veces, y *P. lunatus* de 5 veces). Incluso, se encontró una relación 11 veces mayor en este estudio.

El gigantismo de la semilla, resultado del proceso de domesticación, se debe a una selección metódica e intencional (Darwin 1868), y es una adaptación también a presiones de selección asociadas a la siembra y a la intensa competencia entre plántulas cultivadas (Harlan 1992). Pero requiere una modificación de las vías metabólicas de las sustancias de reserva, especialmente del almidón y otros azúcares. Este fenómeno se ha observado, por ejemplo en tomates domesticados vs silvestres (Koenig et al. 2013). Efectivamente, se observaron varias modificaciones en el ayocote que se describen a continuación.

Concentración de almidón, glucosa, fructosa y sacarosa en embrión. Los materiales silvestres destacaron por una concentración sustancialmente mayor de glúcidos (entre dos y 11 veces más en silvestres que en domesticados) en todas sus formas (almidón y azúcares solubles). El hecho que la misma cantidad de carbohidratos tenga un número mayor de

Tabla 4. Biomasa y porcentaje de distribución en raíz, vástago y cotiledón remanente en las variedades mejorada (Blanco Tlaxcala) y nativas (Nombre de Dios, Zitlaltepetl y Tlayacapan), y las formas silvestres (Tezcutzingo y Ocotitlán) de *Phaseolus coccineus*.

Forma	Ayocote	Raíz		Vástago		Cotiledón remanente	
		Biomasa g	%	Biomasa g	%	Biomasa g	%
Domesticada	Blanco Tlaxcala	0.086 c	19.61 ab	0.199 a	47.96 a	0.063 ab	32.43 a
	Nombre de Dios	0.114 b	25.47 a	0.260 a	57.17 a	0.121 ab	17.36 a
	Tlayacapan	0.124 ab	23.06 ab	0.269 a	45.67 a	0.148 a	31.27 a
	Zitlaltepetl	0.147 a	26.21 a	0.242 a	38.66 a	0.236 a	35.13a
Silvestre	Tezcutzingo	0.013 d	15.04 bc	0.044 b	62.30 a	0.037 bc	35.82 a
	Ocotitlán	0.004 e	11.43 c	0.017 c	49.13 a	0.005 c	26.27 a
Domesticada	Promedio	0.1177 a	23.25 a	0.2425 a	49.98 a	0.142 a	25.77 a
Silvestre	Promedio	0.0085 b	13.64 b	0.0305 b	54.25 a	0.021 b	32.11 a

Biomasa = en g plántula⁻¹, % = Porcentaje en relación con la biomasa total de la plántula. Los valores son la media de cuatro repeticiones. Letras diferentes indican diferencia entre formas (Tukey < 0.05).

moléculas, significa que sobre todo los almidones presentan formas con cadenas más cortas. Esto, a su vez, hace más eficiente el trabajo de las amilasas por razones de un acceso más fácil, y es congruente que así se presenten concentraciones mayores de azúcares cortos. Significa también que los materiales domesticados modifican su metabolismo para producir y almacenar almidones más largos, lo cual está asociado a la presencia de enzimas desramificadoras (Bernal & Martínez-Barajas 2006) que fueron observadas en los materiales domesticados, excepto en Blanco Tlaxcala. También se observaron diferencias significativas en las concentraciones de los carbohidratos entre variedades domesticadas.

Esta es una observación novedosa en *Phaseolus* como un efecto de la domesticación. Por ejemplo, se ha encontrado que en plantas de frijol, las vainas en desarrollo muestran diferentes patrones de acumulación de azúcares entre cultivares (VandenLangenberg *et al.* 2012). Sin embargo, no se ha estudiado la concentración (o sea, la cantidad total vs. el número de moléculas que en este estudio se determinaron). Se confirman datos previos que la sacarosa es el azúcar corto con mayor presencia y principal compuesto móvil (Bewley *et al.* 2013). Sin embargo, puede haber diferencias entre especies. Durante la germinación del arroz, la glucosa y la fructosa son los azúcares más abundantes (Cheng *et al.* 2015). Igualmente, se ha encontrado que la movilización de azúcares durante la germinación puede diferir sustancialmente entre germoplasma silvestre y domesticado, en el caso de pastos (Zhao *et al.* 2018).

Detección de enzimas que degradan el almidón en el cotiledón. Se observó diversidad en el número y las características de las enzimas que degradan el almidón. Si bien los dos silvestres tuvieron un patrón similar, había más

diversidad en los domesticados. Sobre todo, los dos materiales de testa oscura parecen tener enzimas con estructuras distintas a las demás. Estos resultados muestran que el estudio de las enzimas degradadoras de azúcares es un campo prometedor para entender los efectos de la domesticación, y la diversificación de los cultivos nativos posterior a su domesticación.

Aunque en la literatura actual no se comparan enzimas en embriones de semillas germinadas domesticadas y silvestres de una misma especie, sí se sabe que diversas enzimas hidrolizan el almidón. En embriones de chícharo (*Pisum sativum* L.) en germinación se han identificado diferentes tipos de enzimas desramificadoras (Zhu *et al.* 1998), en la síntesis de amilopectina en tubérculos de papa existen diferentes isoformas de sintasas de almidón que actúan en forma sinérgica (Edwards *et al.* 1999).

Biomasa en raíz, vástago, plántula y cotiledón remanente de plántulas. La mayor biomasa del embrión de los domesticados se reflejó en una mayor biomasa en la plántula, y mayor biomasa remanente en los cotiledones. Esto era de esperarse y se ha encontrado en otras especies también. Por ejemplo, la biomasa de plántulas de chirivía (*Pastinaca sativa* L.) 10, 20 y 30 días después de la siembra se relacionó positivamente con la biomasa de la semilla (Hendrix *et al.* 1991).

Se esperaba que las reservas de las plantas silvestres, con sus semillas mucho más pequeñas, se hubieran terminado más rápidamente que en las domesticadas, con una marchitez del ápice más temprana. Sí se encontró que los promedios reflejaron el grado de la domesticación (con los extremos de 29 días en el Blanco Tlaxcala vs. 21 días en el Ocotitlán), pero estas diferencias no fueron significativas. Este tema debe ser estudiado con un mayor número de

Asignación de carbohidratos en germinación de *Phaseolus coccineus* L.

Tabla 5. Concentración de almidón, glucosa, fructosa y sacarosa en la raíz de las variedades mejorada (Blanco Tlaxcala) y nativas (Nombre de Dios, Zitlaltepetl y Tlayacapan), y las formas silvestres (Tezcutzingo y Ocotitlán) de *Phaseolus coccineus*.

Forma	Ayocote	Almidón	Glucosa	Fructosa	Sacarosa
μ moles g ⁻¹ de biomasa					
Domesticada	Nombre de Dios	53.84 d	0.30 c	0.35 c	0.35 d
	Blanco Tlaxcala	64.62 d	0.40 c	0.51 c	0.58 d
	Zitlaltepetl	130.54 c	3.19 b	0.36 c	3.42 bc
	Tlayacapan	110.81 c	1.57 b	1.54 b	1.80 c
Silvestre	Ocotitlán	740.99 a	13.20 a	17.44 a	20.51 a
	Tezcutzingo	323.75 b	3.16 b	2.56 b	5.82 b
Domesticada	Promedio	84.00 b	1.37 b	0.61 b	1.47 b
Silvestre	Promedio	502.00 a	5.17 a	8.51 a	12.11 a

Cada dato es el promedio de cuatro repeticiones. Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa entre ayocotes (Tukey < 0.05).

muestras para tener un dato más próximo a la media real de la población (Oehlert 2000). Además, en las plantas, el estrés por energía ocasiona la detención del crecimiento y redirige la actividad celular hacia el metabolismo básico y la respiración (Rolland *et al.* 2006, Lastdrager *et al.* 2014). Dicho estrés fue ocasionado por la oscuridad prolongada, en la cual las plantas se desarrollaron y que se tradujo en el marchitamiento de la parte sub-apical del vástago por la inanición.

Las plántulas domesticadas y las silvestres tuvieron más biomasa en el vástago que en la raíz, confirmando resultados previos (p. ej. Díaz-Ruiz 2012, para plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. domesticado). Sin embargo, se esperaba una mayor asignación de biomasa a la raíz, proporcionalmente, en los silvestres. Generalmente, la literatura indica que las formas silvestres tienen una asignación mayor a la raíz que las domesticadas en plantas adultas (p. ej. en teocintle, el maíz silvestre, Szoboszlai *et al.* 2015). Esto no se observó, al contrario; es posible que las plántulas de esta especie tengan otro comportamiento.

Concentración de almidón, glucosa, fructosa y sacarosa en raíz y vástago. El resultado más interesante fue la alta concentración de azúcares, tanto de almidón como de azúcares cortos, en la raíz de los materiales silvestres. Pero, también había diferencias entre los domesticados, con valores menores en los materiales de testa blanca. Las silvestres también tuvieron concentraciones más altas de almidón en el vástago, pero en los demás azúcares las diferencias eran menores. Nuevamente, se observaron diferencias significativas entre los domesticados, con una tendencia de más azúcares en los materiales oscuros.

Estudios recientes indicaron que la diversidad de transcriptomas entre órganos de plántulas de frijol común es

mayor en la raíz debido a que es el primer órgano que se desarrolla después de la germinación (Singh *et al.* 2018). Los transcriptomas son moléculas de ARN que se traducen en proteínas dentro de las células, y su mayor diversidad en la raíz quizá les permite codificar una mayor cantidad de enzimas que hidrolizan el almidón. Se tendría que ver si existen diferencias en la transcripción entre materiales o si se debe a una configuración distinta de almidones.

Este comportamiento, en conjunto con los resultados sobre la biomasa, sugieren que los materiales silvestres siguen una estrategia de no invertir en más biomasa de raíz al inicio, pero sí acumular las reservas para poder crecer rápidamente una vez que perciben otros factores del ambiente. Esta estrategia es la adecuada cuando el ambiente puede ser errático, y no es tan exitoso si la planta cuenta con condiciones ambientales adecuadas, como en los domesticados.

Esta interpretación es apoyada por el hecho que los materiales más domesticados, los de testa blanca, tenían las menores concentraciones de almidones en la raíz, pero las concentraciones en el vástago eran similares en todos los domesticados. Este resultado también confirma que las plántulas están constituidas por subunidades morfológicas y fisiológicas que funcionan como estructuras autónomas con respecto a la asimilación, distribución y asimilación del carbono (Watson & Casper 1984).

Cabe mencionar que se confirmaron los resultados previos de que la sacarosa es el azúcar corto más abundante. Tanto en los ayocotes domesticados como en las silvestres, la concentración de sacarosa por gramo de biomasa es mayor que la concentración de glucosa y fructosa. La gluconeogénesis que ocurre en las semillas en germinación proporciona la glucosa para la síntesis de sacarosa (Nelson & Cox 2015) y en plántulas de frijol común la sacarosa es el

Tabla 6. Concentración de almidón, glucosa, fructosa y sacarosa en el vástago de las variedades mejorada (Blanco Tlaxcala) y nativas (Nombre de Dios, Zitlaltepetl y Tlayacapan), y las formas silvestres (Tezcutzingo y Ocotitlán) de *Phaseolus coccineus*.

Forma	Ayocote	Almidón Glucosa Fructosa Sacarosa			
		μ moles g ⁻¹ de biomasa			
Domesticada	Nombre de Dios	44.60 b	0.45 c	0.46 b	0.57 c
	Blanco Tlaxcala	48.24 b	1.32 b	1.20 a	1.29 b
	Zitlaltepetl	47.30 b	2.26 a	2.28 a	2.33 ab
	Tlayacapan	44.59 b	1.43 ab	1.66a	1.80 ab
Silvestre	Ocotitlán	160.79 a	1.24 b	0.48 b	1.14 bc
	Tezcutzingo	109.59 a	1.42 ab	1.32 a	3.18 a
Domesticada	Promedio	46 b	1.29 a	1.35 a	1.50 a
Silvestre	Promedio	131 a	1.34 a	0.96 a	2.50 a

Cada dato es el promedio de cuatro repeticiones. Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa entre ayocotes (Tukey < 0.05).

azúcar que más se transporta del mesófilo a las nervaduras (Köcher & Leonard 1971). Sin embargo, no se había medido anteriormente en plántulas desarrolladas en oscuridad, sólo en juveniles y adultos.

Se muestra que el metabolismo de los azúcares varía considerablemente entre diferentes materiales de *Phaseolus coccineus*. También se identificaron varios patrones que diferencian los silvestres de los domesticados, pero casi siempre en un gradiente; esto es debido a que se tuvieron: material seleccionado por métodos de mejoramiento genético, donde la presión de selección es muy alta; material seleccionado por agricultores, donde la presión de selección no es muy alta y; material silvestre seleccionado naturalmente, donde la presión de selección es baja.

Es importante señalar que resultó fructífera la determinación de concentraciones (número de moléculas por gramo, que son los agentes activos en el metabolismo) en vez de contenidos, que es la medida estándar que se utiliza en la literatura. Se encontró que los materiales silvestres probablemente tienen moléculas más pequeñas de almidón. Se propone, que por su menor tamaño son más activas químicamente, se degradan más fácilmente con la ayuda de las enzimas, y por lo tanto liberan más azúcares solubles. Igualmente se encontró una asignación importante de azúcares a la raíz de las plántulas de materiales silvestres (y en forma gradual en las domesticadas), la cual probablemente faculta a la planta de reaccionar más rápidamente a señales del ambiente. La menor concentración de almidón, glucosa, fructosa y sacarosa en el embrión, y la plántula de los materiales domesticados, podría considerarse un costo de la domesticación (Martínez-Ainsworth & Tenaillon 2016).

Agradecimientos

La primera autora agradece al CONACyT por haberle otorgado la beca para realizar sus estudios doctorales, a la Dra. Iris Grisel Galván Escobedo por el apoyo brindado en la obtención microfotografías de los amiloplastos y al M.C. Antonio García Esteva por el apoyo en el desarrollo de esta investigación.

Literatura citada

- Alvarado-López AN, Gómez-Oliván LM, Heredia JB, Baeza-Jiménez R, García-Galindo HS, López-Martínez LX. 2019. Nutritional and bioactive characteristics of ayocote bean (*Phaseolus coccineus* L.): an underutilized legume harvested in Mexico. *CyTA-Journal of Food* **17**: 199-206. DOI: <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1571530>
- Bernal L, Martínez-Barajas E. 2006. Una nueva visión de la degradación del almidón. *Revista del Centro de Investigación*. Universidad La Salle **7**: 77-90.
- Beleggia R, Rau D, Laidò G, Platani C, Nigro F, Fragasso M, De Vita P, Scossa F, Fernie AR, Nikoloski Z, Papa R. 2016. Evolutionary metabolomics reveals domestication-associated changes in tetraploid wheat kernels. *Molecular Biology and Evolution* **33**: 1740-1753. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw050>
- Bjergegaard C, Gulewicz K, Horbowicz M, Jones A, Kadlec P, Kintia P, Kratchanov C, Kratchanova M, Lewandowicz G, Soral-Smietana M, Sorensen H, Urban J. 2001. Carbohydrate chemistry. In: Hedley CL, ed. *Carbohydrates in Grain Legume Seeds: Improving*

- Nutritional Quality and Agronomic Characteristics*. UK: CABI pp. 15-59. ISBN-13: 978-0851994673
- Bewley JD, Bradford KJ, Hillhorst HWM, Nonogaki H. 2013. Mobilization of stored reserves. In: Bewley JD, Bradford KJ, Hillhorst HWM, Nonogaki H, eds. *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. New York: Springer. pp- 183-246. ISBN-13: 978-1461446927
- Chacón-Sánchez MI. 2018. The domestication syndrome in *Phaseolus* crop plants: A review of two key domestication traits. In: Pontarotti, P, ed. *Origin and Evolution of Biodiversity.*, Switzerland: Springer. 37-59. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-95954-2_3
- Cheng X, Cheng J, Huang X, Lai Y, Wang L., Du W, Wang Z, Zhang H. 2013. Dynamic quantitative trait loci analysis of seed reserve utilization during three germination stages in rice. *PLoS One* **8**: 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080002>
- Cheng J, Cheng X, Wang L, He Y, An C, Wang Z, Zhang H. 2015. Physiological characteristics of seed reserve utilization during the early seedling growth in rice. *Brazilian Journal of Botany* **38**: 751-759. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40415-015-0190-6>
- Darwin CR. 1868. *The Variation of Animals and Plants under Domestication*. London: John Murray. http://darwin-online.org.uk/converted/published/1868_Variation_F877/1868_Variation_F877.2.html (accessed October 2018).
- Deboucq DG. 1994. Beans (*Phaseolus* spp). In: Hernández Bermejo JE, León J, eds. *Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective*. FAO Plant Production and Protection Series 29: 47-62.
- Díaz-Ruiz R. 2012. The distribution of dry matter in bean seedlings in light and darkness conditions. In: Najafpour MM, ed. *Applied Photosynthesis*: Rijeka, Croatia IntechOpen. Pp. 335-352 <http://www.intechopen.com/books/applied-photosynthesis/the-distribution-of-dry-matter-in-bean-seedlings-in-light-and-darkness-conditions> (accessed september 2019).
- Edwards A, Fulton DC, Hylton CM, Jobling SA, Gidley M, Rössner U, Martin C, Smith AM. 1999. A combined reduction in activity of starch synthases II and III of potato has novel effects on the starch of tubers. *The Plant Journal* **17**: 251-261. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00371.x>
- Escalante AM, Coello G, Eguiarte LE, Piñero D. 1994. Genetic structure and mating systems in wild and cultivated populations of *Phaseolus coccineus* and *P. vulgaris* (Fabaceae). *American Journal of Botany* **81**: 1096-1103. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1994.tb15603.x>
- Fuller DQ, Allaby R. 2009. Seed dispersal and crop domestication: shattering, germination and seasonality in evolution under cultivation. *Annual Plant Reviews* **38**: 238-295. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781444314557.ch7>
- Harlan JR. 1992. *Crops and Man*. Madison, WI: American Society of Agronomy. Online ISBN: 9780891185659; DOI: <https://doi.org/10.2135/1992.cropsandman>
- Hendrix SD, Nielsen E, Nielsen T, Schutt M. 1991. Are seedlings from small seeds always inferior to seedlings from large seeds? Effects of seed biomass on seedling growth in *Pastinaca sativa* L. *The New Phytologist* **119**: 299-305. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1991.tb01034.x>
- Johansen DA. 1940. *Plant microtechnique*. New York: McGraw Hill Book Company, Inc.
- Kafekuda G, Duke SH. 1984. Electrophoretic transfer as a technique for the detection and identification of plant amylolytic enzymes in polyacrylamide gels. *Plant Physiology* **75**: 278-280 DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.75.1.278>
- Kaplan L. 1965. Archeology and domestication in American *Phaseolus* beans. *Economic Botany* **19**: 358-368. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02904806>
- Köcher H, Leonard OA. 1971. Translocation and metabolic conversion of ¹⁴C-labeled assimilates in detached and attached leaves of *Phaseolus vulgaris* L. in different phases of leaf expansion. *Plant Physiology* **47**: 212-216. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.47.2.212>
- Koenig D, Jiménez-Gómez JM, Kimura S, Fulop D, Chitwood DH, Headland LR, Kumar R, Covington MF, Devisetty UK, Tat AV, Tohge T, Bolger A, Schneeberger K, Ossowski S, Lanz C, Xiong G, Taylor-Teeples M, Brady SM, Pauly M, Weigel D, Usadel B, Fernie AR, Peng J, Sinha NR, Maloof JN. 2013. Comparative transcriptomics reveals patterns of selection in domesticated and wild tomato. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **110**: E2655-62. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1309606110>
- Lastdrager J, Hanson J, Smeekens S. 2014. Sugars signals and the control of plant growth and development. *Journal of Experimental Biology* **65**: 799-807. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/ert474>
- Martínez-Ainsworth NE, Tenaillon MI. 2016. Superheroes and masterminds of plant domestication. *Comptes Rendus Biologies* **339**: 268-273. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crv.2016.05.005>
- Milla R, Matesanz S. 2017. Growing larger with domestication: a matter of physiology, morphology or allocation? *Plant Biology* **19**: 475-483. DOI: <https://doi.org/10.1111/plb.12545>
- Miranda-Colín S. 1979. Evolución de *Phaseolus vulgaris* y *P. coccineus*. In: Engleman ME, ed. *Contribuciones al Conocimiento de Frijol (Phaseolus) en México*.

- Chapingo, México: Colegio de Postgraduados, pp. 83-99.
- Munsell. 2011. Munsell color chart for plant tissues: with genuine Munsell color chips. Munsell Color x-rite. USA: Grand Rapids MI,
- Nelson DL, Cox MM. 2015. *Lehninger: Principios de Bioquímica*. Barcelona: Omega. ISBN-13: 978-8428216036
- Nik SMM, Tilebeni H, Zeinali E, Tavassoli A. 2011. Effects of seed ageing on heterotrophic seedling growth in cotton. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* **10**: 653-657.
- Noda-García L, Liebermeister W, Tawfik DS. 2018. Metabolite-enzyme coevolution: from single enzymes to metabolic pathways and networks. *Annual Review of Biochemistry* **87**: 187-216. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012023%20>
- Oehlert GW. 2000. *A first course in design and analysis of experiments*. USA WH Freeman and Company. ISBN-13: 978-0716735106
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 675-709. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441>
- SAS. 2012. Statistical Analysis System. V.9.1 ed. SAS. Institute. Inc. N.C. USA: Cary.
- Singh J, Zhao J, Vallejos CE. 2018. Differential transcriptome patterns associated with early seedling development in a wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) accession. *Plant Science* **274**: 153-162. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.05.024>
- Szoboszlay M, Lambers J, Chappell J, Kupper JV, Moe LA, McNear DH Jr. 2015. Comparison of root system architecture and rhizosphere microbial communities of Balsas teosinte and domesticated corn cultivars. *Soil Biology and Biochemistry* **80**: 34-44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.09.001>
- Tayade R, Kulkarni KP, Jo H, Song JT, Lee JD. 2019. Insight into the prospects for the improvement of seed starch in legume-A review. *Frontiers in Plant Science*. DOI: <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffpls.2019.01213>
- Urrialde de Andrés R. 1992. Estudio del contenido nutritivo de semillas de *Phaseolus*. No publicado. PhD. Thesis. Universidad Complutense de Madrid.
- Vargas-Vázquez MLP, Muruaga-Martínez JS, Mayek-Pérez N, Pérez-Guerrero A, Ramírez-Sánchez SE. 2014. Characterization of the runner bean (*Phaseolus coccineus* L.) of the Trans-Mexican Neovolcanic Belt and Sierra Madre Oriental. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* **5**: 191-200.
- VandenLangenberg KM, Bethke PC, Nienhuis J. 2012. Patterns of glucose, and sucrose accumulation in snap and dry beans (*Phaseolus vulgaris*) pods. *Hortscience* **47**: 874-878. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.7.874>
- Viola R, Davies HV. 1992. A microplate reader assay for rapid enzymatic quantification of sugars in potato tubers. *Potato Research* **35**: 55-58. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02357723>
- Watson MA, Casper BB. 1984. Morphogenetic constraints on patterns of carbon distribution in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **15**: 233-258. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.es.15.110184.001313>
- Yi X, Zhang J, Wang Z. 2015. Large and small acorns contribute equally to early-stage oak seedlings: a multiple species study. *European Journal of Forest Research* **134**: 1019-1026. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10342-015-0906-y>
- Zhao M, Zhang H, Yan H, Qui L, Baskin CC. 2018. Mobilization and role of starch, protein and fat reserves during seed germination of six wild grassland species. *Frontiers in Plant Science* **9**:1-11. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00234%20>
- Zhu SP, Hylton CM, Rossner U, Smith AM. 1998. Characterization of starch-debranching enzymes in Pea embryos. *Plant Physiology* **118**: 581-590. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.118.2.581>

Editor de sección: Joel Flores

Contribución de los autores: MLPVV diseñó los experimentos, analizó los datos y escribió este trabajo; EUM diseñó los experimentos de distribución de biomasa, revisó y corrigió este trabajo; DPC diseñó los experimentos de concentración de carbohidratos y separación enzimática y revisó este trabajo; HV contribuyó en el escrito y presentación de resultados de este trabajo; JKS contribuyó en la dirección de este trabajo; SMC contribuyó en la dirección de este trabajo; PYJ hizo los cortes y las preparaciones microscópicas de los cotiledones.