



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Facultad de Química

**ESTUDIO DEL METABOLISMO DE ALMIDÓN EN VAINAS DE FRUTOS DE FRIJOL Y DE
SU IMPORTANCIA EN EL DESARROLLO DE LA SEMILLA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.B RAYMUNDO BELMONT VALADEZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS

Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO

Facultad de Química, UNAM

DR. JORGE NIETO SOTELO

Instituto de Biología, UNAM

Ciudad de México. Mayo, 2021



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.

SITIO DONDE SE DESARROLLA EL TEMA:

Laboratorio 102 Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

TUTOR PRINCIPAL:

DR. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. LILIA ANGÉLICA BERNAL GRACIDA

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eleazar Martínez Barajas por su asesoría durante la realización de este trabajo, y por su apoyo en mi formación académica.

A la Dra. Sobeida Sánchez Nieto y al Dr. Jorge Nieto Sotelo por formar parte del comité tutor que supervisó el desarrollo de este trabajo.

Al Jurado de Examen conformado por: Dra. Gladys Iliana Cassab López, Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar, Dra. Helena Porta Ducoing, Dra. Rosana Sánchez López, Dra. Aurora Lara Núñez. Por sus revisiones que contribuyeron a mejorar la calidad de este trabajo.

A la Dra. Lilia Angélica Bernal Gracida por su gran apoyo en los experimentos realizados en este trabajo.

Al Dr. Daniel Padilla Chacón por sus valiosas observaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría.

Agradecemos el apoyo otorgado por la Facultad de Química (PAIP 5000-9127) y DGAPA (Proyecto IN226520: Estudio de la importancia del almidón acumulado en la vaina de los frutos, para mantener el desarrollo de las semillas, en plantas de frijol afectadas por sequía transitoria).

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 El frijol y su importancia en la alimentación humana	2
2.2 El almidón, un metabolito valioso para las plantas	6
2.2.1 La síntesis de los gránulos de almidón	7
2.2.2 La síntesis de ADP-glucosa, materia prima para la síntesis de almidón	10
2.2.3 Regulación de la actividad de la AGPasa	12
2.2.4 Factores que regulan la síntesis de almidón	14
2.2.5 La función del almidón en los diferentes tejidos de las plantas	16
2.2.6 El almidón y su función en la tolerancia al estrés	18
2.3 La importancia de la vaina en el desarrollo de las semillas	19
2.3.1 El almidón presente en la vaina de frijol podría ser una característica útil bajo condiciones de estrés	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÒTESIS	22
5. OBJETIVO GENERAL	22
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	22
6. MATERIAL Y MÉTODOS	23
6.1 Material biológico	23
6.2 Extracción de azúcares solubles	23
6.3 Digestión de almidón	24
6.4 Cuantificación de azúcares solubles	24

6.5 Cuantificación de almidón -----	25
6.6 Extracción y cuantificación de proteínas -----	25
6.7 Determinación de actividades enzimáticas -----	26
6.8 Fijación de ¹⁵ CO ₂ y distribución de fotosintatos -----	29
6.9 Inmunodetección -----	31
6.10 Cuantificación del contenido de clorofilas -----	32
6.11 Cuantificación del flujo de sacarosas hacia los frutos -----	32
6.12 Observación de estomas -----	32
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	33
7.1 Cuantificación de los carbohidratos presentes en la vaina de diferentes genotipos de frijol -----	33
7.2 Análisis de las actividades enzimáticas -----	34
7.3 Distribución de ¹⁴ C en frutos de frijol -----	37
7.4 Efecto del desarrollo de los frutos sobre la actividad fotosintética de la vaina -----	40
7.5 Análisis de la actividad fotosintética de la vaina -----	42
7.6 La fotosíntesis de la vaina y su relación con el contenido de carbohidratos y el desarrollo de las semillas -----	45
7.7 Análisis del estado redox de la AGPasa -----	49
7.8 La vaina puede tener un límite de almacenamiento de carbono-----	54
8. CONCLUSIONES -----	55
9. PERSPECTIVAS -----	55
10. REFERENCIAS -----	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de la planta de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) en su etapa reproductiva-----	3
Figura 2. Consumo mundial de frijol del 2003 al 2011-----	5
Figura 3. Producción mundial de frijol del 2003 al 2011-----	5
Figura 4. Estructura de la amilosa y la amilopectina-----	7
Figura 5. Diagrama del metabolismo de almidón-----	11
Figura 6. Regulación de la actividad de AGPasa-----	12
Figura 7. Almidón en vainas de frutos de frijol-----	20
Figura 8. Efecto de la disponibilidad de nutrientes sobre el desarrollo de las semillas de frijol-----	21
Figura 9. Ensayo enzimático usado para la cuantificación de azúcares solubles---	24
Figura 10. Análisis de la distribución carbono fotosintetizado-----	30
Figura 11. Contenido de carbohidratos en vainas de frutos de frijol de 20 DDA en diferentes genotipos-----	33
Figura 12. Enzimas y compuestos involucrados en la biosíntesis del almidón-----	34
Figura 13. Actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de carbono en vainas de frutos de frijol-----	35
Figura 14. Análisis de la cantidad de ^{14}C presente en las vainas producto de la actividad fotosintética de frutos y hojas-----	37
Figura 15. Distribución de ^{14}C en vainas de frutos de frijol producto de la actividad fotosintética de las hojas y de los frutos-----	38
Figura 16. Análisis de la actividad fotosintética de los frutos durante su desarrollo-	41
Figura 17. Porcentaje de distribución de ^{14}C en la vaina y semillas a través del tiempo, producto de la actividad fotosintética de los frutos-----	42

Figura 18. Cuantificación de clorofila en vainas de frutos de frijol-----	43
Figura 19. Análisis de la actividad y la cantidad de Rubisco presente en vainas de frutos de los genotipos C60 y G26 de 20 DDA-----	43
Figura 20. Análisis de las características de los estomas presentes en las vainas de frutos de frijol de 20 DDA-----	44
Figura 21. Efecto de la luz sobre el contenido de clorofila total en vainas durante el desarrollo frutos de frijol que fueron cubiertos a 10 DDA-----	46
Figura 22. Efecto del desarrollo y de la luz sobre la cantidad de subunidad grande de Rubisco presente en vainas de frutos de frijol de los genotipos Canario 60 y G26-----	47
Figura 23. Efecto de la actividad fotosintética del fruto en el contenido de carbohidratos en vainas y sobre el desarrollo de las semillas-----	49
Figura 24. Inmunodetección de la subunidad catalítica de la AGPasa presente en vainas de frutos de frijol de los genotipos Canario 60 y G26, desarrollados en luz y oscuridad-----	51
Figura 25. Flujo se sacarosa hacia los frutos-----	53
Figura 26. Distribución del carbono en las vainas de frutos de frijol a través del tiempo-----	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de minerales y nutrientes en el frijol considerando una porción de 125 g-----	4
Tabla 2. Análisis de la distribución de ¹⁴ C en vainas y semillas incorporado como ¹⁴ CO ₂ por frutos y hojas de frijol-----	39

ABREVIACIONES

3PGA. 3-fosfoglicerato.

ABA. Ácido abscísico.

ADP. Difosfato de adenosina,

AGPasa. ADP glucosa pirofosforilasa.

AMY. α -amilasa.

ApL3. Gen que codifica para la subunidad grande de la AGPasa.

ATP. Trifosfato de adenosina.

BE. Enzima ramificadora.

BMV. β -amilasa.

BSA. Albúmina sérica bovina.

C60. Genotipo canario 60.

CBF1. Factor de transcripción relacionado con la proteína de unión a centrómero.

CCA1. Factor de transcripción asociado al ciclo circadiano.

CPM. Cuentas por minuto.

CST1. Gen que codifica para la proteína cistatina-SN.

DBE. Enzima desramificadora.

DMSO. Dimetilsulfóxido.

DPE. Enzima desproporcionadora.

DTT. Ditioneitol.

EDTA. Ácido etilendiaminotetraacético.

EGTA. Ácido egtáxico.

ELISA. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

F6P. Fructosa-6-fosfato.

Fk. Fructocinasa.

G15. Genotipo 15.

G1P. Glucosa-1- fosfato.

G26. Genotipo 26.

G6P. Glucosa-6-fosfato.

G6PDH. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
GBSS. Almidón sintasa que se une al gránulo.
Gk. Glucocinasa.
GLT. Transportador de glucosa.
GPT. Translocador G6P/fosfato.
GWD. Glucan agua dicinasa.
Inv. Invertasa.
KOH. Hidróxido de potasio.
LHY. Gen que codifica para la proteína alargadora tardía de hipocotilo. Factor de transcripción.
MEX1. Transportador de maltosa.
MFP1. Proteína similar a filamento de unión a MAR.
MgCl₂. Cloruro de magnesio.
Mpb. Mega pares de bases.
MRC. Proteína de cloroplasto similar a miosina.
NADPH. Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
NTRC. Tiorredoxina reductasa C dependiente de NADPH.
NTT. Translocador de nucleótido.
OsMYB. Factor de transcripción presente en arroz que inhibe la expresión de BMVs.
OTI. Genotipo OTI.
PGI. Fosfogluco isomerasa.
PGM. Fosfoglucomutasa.
Pho1. Almidón fosforilasa del plastidio.
Pi. Fosfato inorgánico.
PPi. Pirofosfato.
PTST. Proteína dirigida al almidón.
PVDF. Fluoruro de polivinilideno.
PVPP. Polivinilpirrolidona.
RUBISCO. Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa.
SAE. Solución amortiguadora de extracción.
SBDCP1. Proteína que contiene el dominio de unión al almidón.
SnRK. Proteína cinasa relacionada a SNF.

SPS. Sacarosa fosfato sintasa.

SS. Almidón sintasa.

SuSy. Sacarosa sintasa.

T6P. Trehalosa-6-fosfato.

TPS. T6P sintasa.

TPT. Translocador de triosas-fosfato/fosfato.

UDP. Uridina difosfato.

WRKY. Familia de factores de transcripción caracterizados por tener el dominio WRKY.

β -Me. β -mercapto etanol.

1. RESUMEN

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es uno de los cultivos más importantes en la alimentación humana, su alto contenido de proteínas y minerales lo convierten en un alimento muy completo. Las vainas de los frutos de frijol juegan un papel fundamental en el desarrollo de las semillas, además de protegerlas, estas estructuras regulan la distribución los fotosintatos. Las vainas acumulan cantidades importantes de almidón. Su presencia tiene relación directa con el estado nutricional de las plantas y su degradación forma parte de los mecanismos que les permiten enfrentar los efectos negativos de la falta de nutrientes. Hemos observado grandes diferencias en la cantidad de almidón que se acumula en las vainas de algunos genotipos. Por la importancia que esto podría tener en el desarrollo de las semillas bajo condiciones ambientales adversas, los objetivos del presente proyecto, son establecer los aspectos que regulan la síntesis de almidón en las vainas de los frutos de frijol y las bases moleculares de las diferencias entre genotipos. Nuestros resultados muestran que en condiciones ideales de cultivo, la actividad fotosintética de las vainas no es determinante para la acumulación de almidón y el desarrollo de semillas.

2. ANTECEDENTES

2.1 El frijol y su importancia en la alimentación humana

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es una especie diploide con 11 pares cromosomales que contienen un total de 30391 genes y un tamaño de 635 Mpb (FAO, 2018).

Las plantas de frijol son herbáceas, anuales y predominantemente autógamas. Desarrollan sus semillas dentro de vainas y dependiendo de su hábito de crecimiento, puede alcanzar alturas hasta de dos metros (Figura 1).

La especie tiene su centro de origen en Mesoamérica entre los años 5000 y 2000 a.C. (Bitocchi *et al.*, 2012). Estudios arqueológicos ubican a las regiones de Mesoamérica y el norte de los Andes como los centros de origen del género *Phaseolus*, lo que se refleja en dos grandes acervos genéticos (mesoamericano y andino). En México existen tres razas genéticas locales: Durango, Jalisco y Mesoamérica; y una introducida, conocida como Nueva Granada. La diversidad genética disponible permite que el frijol se cultive en todos los estados del país, en diferentes épocas y con varios sistemas de producción (Muñoz, 2010).

El frijol es una especie tropical que se puede cultivar en regiones que van de los 52° latitud norte a los 32° latitud sur y desde el nivel del mar hasta más de 3000 m de altura en áreas donde no existan riesgos de heladas. Las plantas se desarrollan mejor a temperaturas entre 18 y 24 °C; sin embargo, algunas variedades también lo pueden hacer en zonas más frías o más calurosas. Las temperaturas mínimas recomendadas para su desarrollo están relacionadas con las etapas del cultivo, es decir, de 8 a 10 °C para la germinación, 15 °C para la floración y de 18 a 20 °C para la madurez. Este cultivo es susceptible tanto al déficit como al exceso de agua. Precipitaciones de entre 350 y 600 mm durante todo el ciclo son ideales para el desarrollo exitoso del cultivo.

El frijol puede asociarse simbióticamente con bacterias del género *Rhizobium*, que se alojan en el sistema radicular, donde forman numerosos nódulos pequeños que reciben de la planta los nutrientes necesarios para su metabolismo. Estas bacterias llevan a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico, haciéndolo asimilable para la planta. Parte del nitrógeno fijado queda en la materia orgánica que se forma con los restos de la cosecha, beneficiando a los cultivos posteriores y reduciendo la necesidad de utilizar fertilización química, contribuyendo a mantener la biodiversidad de los suelos y a enriquecer el ecosistema (FAO, 2018).

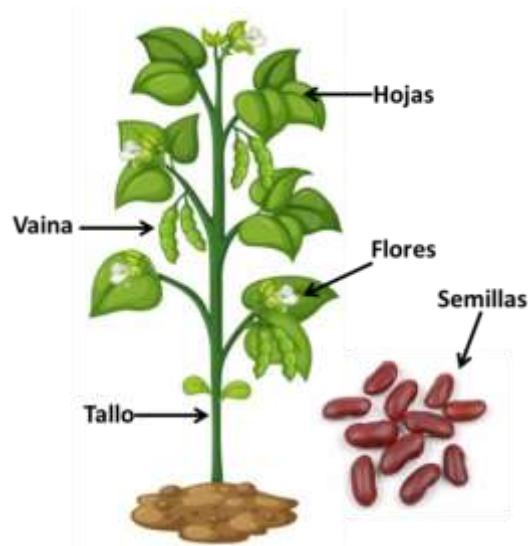


Figura 1. Esquema general de la planta de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en su etapa reproductiva. Esta planta puede alcanzar alturas de hasta dos metros dependiendo de la variedad. Sus semillas se desarrollan dentro de una vaina.

La mayor parte del frijol se consume como grano seco. Sus semillas son fuente de carbohidratos y destacan por su alto contenido proteico (dependiendo del tipo de frijol, el contenido varía del 14 al 33% del peso seco). En este sentido, las proteínas contenidas en las semillas son ricas en aminoácidos como la lisina, fenilalanina y tirosina (Broughton *et al.*, 2002). Las semillas de frijol también contienen cantidades importantes de vitaminas y minerales (principalmente hierro y zinc) (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido de minerales y nutrientes en el frijol considerando una porción de 125 g. Tabla basada en Broughton *et al.*, 2002.

Nutriente	Contenido en una proporción de 125 g (cocinados)	Requerimiento en la dieta de un adulto promedio (mg)	% presente en una porción requerida para un adulto promedio
Sodio	0 mg	2200	0
Potasio	475 mg	3900	1
Calcio	65 mg	800	8
Fósforo	161 mg	800	20
Magnesio	56 mg	350	16
Hierro	2.78 mg	10	27
Zinc	1.24 mg	15	8
Cobre	0.307 mg	2.5	12
Manganeso	0.668 mg	3.75	18
Selenio	0.002 mg	0.05-0.2	1-4
Yodo	0.032 mg	150	0
Almidón	22.1 g	570 (2750 kcal.)	4
Proteínas	8.5 g	69 g	12

El consumo mundial de frijol se estima en alrededor de 17 millones de toneladas, el 57.7% es consumido en India, Brasil, Estados Unidos, México y Tanzania (Figura 2).

La producción mundial de frijol excede las 25 millones de toneladas, siendo India (16.4%), Myanmar (14.9%), Brasil (13.1%), Estados Unidos (5.3%), México (5.1%), China (4.1%) y Tanzania (4.1%) los productores más importantes (Figura 3).

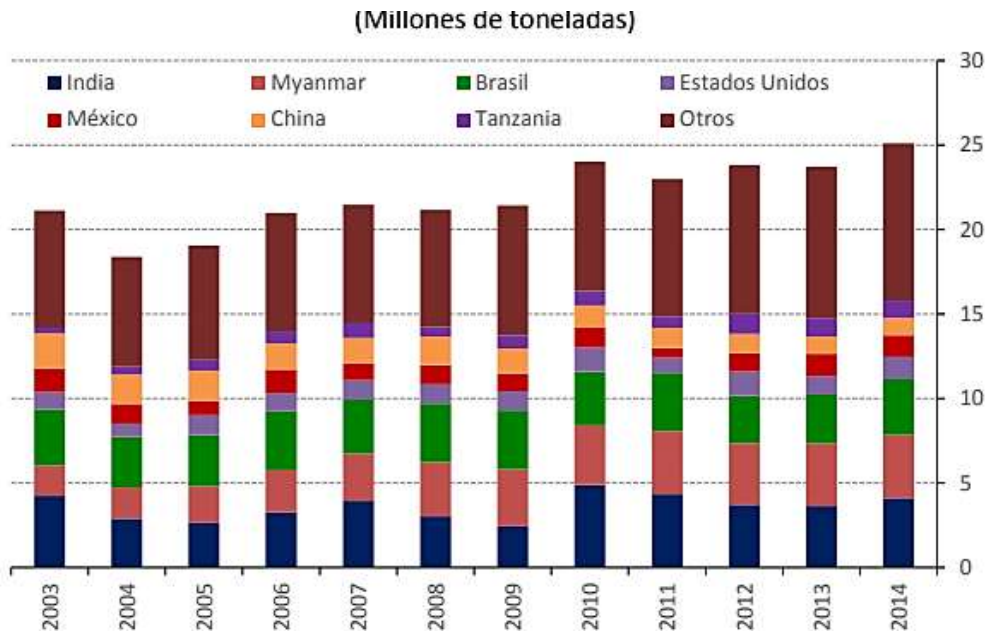


Figura 2. Consumo mundial de frijol del 2003 al 2011. México se encuentra entre los 5 países que más consumen esta leguminosa. Imagen tomada de FIRA 2016.

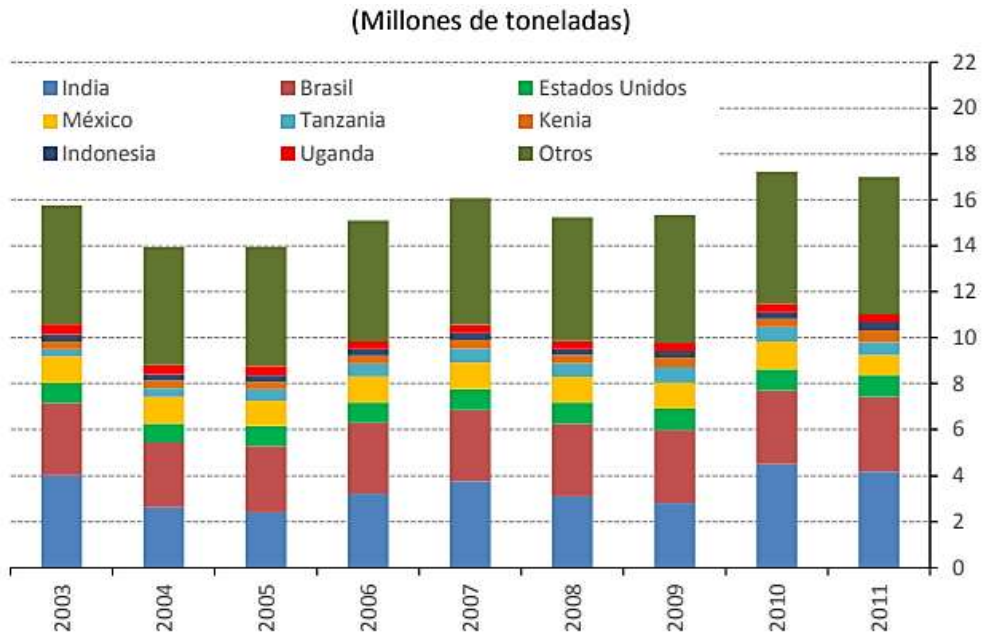


Figura 3. Producción mundial de frijol del 2003 al 2011. En 2014, el rendimiento promedio mundial de frijol se ubicó en 0.83 toneladas por hectárea. Imagen tomada de FIRA 2016.

Se estima que el crecimiento mundial de la población, hará que la demanda de alimentos aumente un 40% durante los próximos cien años (UN, 2019). A ese problema hay que agregar que en gran parte del planeta, la productividad de los cultivos está limitada por condiciones ambientales adversas como la erosión, inundaciones, deforestación, contaminación y la escasez de agua (FAO, 2011). Debido a lo anterior, es necesario desarrollar genotipos más tolerantes al estrés abiótico. Para ello es importante estudiar las estrategias que las plantas han desarrollado a lo largo de su evolución para asegurar su desarrollo aún en condiciones poco favorables.

Entre estos mecanismos de supervivencia está la acumulación de almidón, cuya degradación puede proporcionar la energía y el carbono requeridos para el desarrollo de las semillas (Thalman, *et. al.*, 2017).

2.2 El almidón, un metabolito valioso para las plantas

El carbono fijado en los tejidos fotosintéticos, se utiliza para satisfacer las demandas metabólicas *in situ* y para la síntesis de sacarosa que se transporta a los tejidos heterotróficos. Durante el día la cantidad de carbono fijado es mayor que la empleada en la síntesis de sacarosa; el excedente se usa en la síntesis de almidón que se acumula en las hojas (Pfister y Zeeman 2016).

Por su función biológica, el almidón se clasifica en transitorio y de almacenamiento. El almidón transitorio es el que acumulan las hojas a partir de la fotosíntesis realizada durante el día, mismo que se degrada casi en su totalidad durante la noche para solventar las demandas metabólicas. Por otro lado, el almidón de almacenamiento se sintetiza en tejidos no fotosintéticos como raíces, semillas, tallos y tubérculos, a partir de la sacarosa que llega de los tejidos fotosintéticos y permanece por largos periodos de tiempo, para posteriormente ser utilizado en procesos como la germinación (Pfister y Zeeman 2016).

2.2.1 La síntesis de los gránulos de almidón

El almidón se sintetiza y almacena en los plastidios en forma de gránulos semicristalinos insolubles en agua. El tamaño y la forma de los gránulos varían dependiendo de la especie y del tejido donde se sintetizan. Los de semillas de amaranto tienen un diámetro de 0.5-2 μm , mientras que los de tubérculos de papa son esferas con más de 100 μm de diámetro (Pfister y Zeeman, 2016). Los gránulos de almidón están formados de amilosa y amilopectina. Ambos son polímeros de glucosa unida por enlaces α -1,4 y ramificaciones α -1,6. La amilopectina tiene más ramificaciones y es el componente mayoritario del almidón (constituye del 75 al 90% de los gránulos). Por su parte, la amilosa es una molécula más pequeña y con pocas ramificaciones que rellena los espacios vacíos de la matriz semicristalina formada por la amilopectina (Pérez y Bertoft, 2010) (Figura 4).

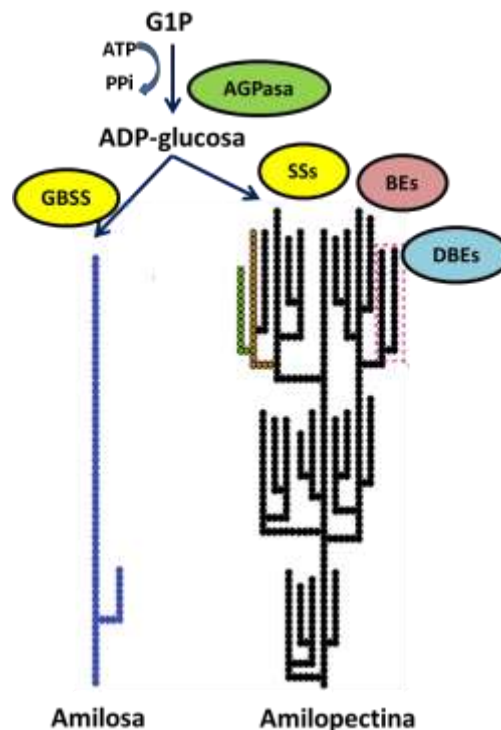


Figura 4. Estructura de la amilosa y la amilopectina. La ADP-glucosa es el donador de glucanos para la síntesis de amilosa y amilopectina. Almidón sintetasas (SSs), almidón sintasa que se une al granulo (GBSS), enzimas ramificadoras (BEs), enzimas desramificadoras (DBEs), ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa). Imagen modificada de Pfister y Zeeman (2016).

La síntesis de los gránulos de almidón es un proceso complejo que involucra la participación coordinada de las amilosa sintasas (SSs), las enzimas ramificadoras (BEs) y de las enzimas desramificadoras (DBEs). Las SSs pertenecen a una familia de glucanotransferasas, que utilizan ADP-glucosa como donador de glucanos para alargar las terminaciones no reducidas de los polímeros de glucosa en la posición del carbono 4, creando así los enlaces α -1,4.

En plantas se conocen seis clases de SSs, una de ellas es la almidón sintasa que se une a los gránulos, por sus siglas en inglés GBSS, cuya función principal es la síntesis de amilosa. Por otro lado, las SS I, II, III y IV son las responsables de sintetizar a la amilopectina; estas enzimas son solubles en el estroma o parcialmente unidas al gránulo. La SS V por su parte, es una enzima que pese a tener una secuencia similar a SS IV, no se conoce con detalle su función (Pfister y Zeeman 2016).

Las enzimas ramificadoras (BEs), tienen actividad de glucanotransferasas y son las encargadas de introducir las ramificaciones α -1,6 en los polímeros de glucosa. Las enzimas desramificadoras (DBEs) hidrolizan algunas ramificaciones y su actividad es necesaria para que los gránulos adquieran su estructura (Geigenberger 2011).

Se ha intentado establecer la aportación específica de cada una de las enzimas que participan en la síntesis del almidón. Sin embargo, se ha reportado que pueden formar complejos entre ellas y con otras proteínas que afectan la actividad y dificultan la interpretación de los resultados (Pfister y Zeeman, 2016).

Todas las enzimas participantes en la síntesis de almidón están altamente conservadas en diferentes especies, lo que sugiere un origen común (Deschamps *et al.*, 2008). Sin embargo, todas tienen isoformas cuya expresión varía dependiendo de la etapa de desarrollo de las hojas y de estímulos ambientales. En general, la abundancia de los transcritos de las enzimas que participan en la síntesis de almidón responde a un ciclo diurno y a la disponibilidad de azúcares. Por ejemplo, en hojas de *Arabidopsis thaliana*, la expresión del gen GBSS1 es controlada por los factores de transcripción LHY y CCA1, que están asociados al ciclo circadiano (Van Harselaar *et al.*, 2017).

En *Arabidopsis thaliana* los genes del metabolismo del almidón pueden agruparse en clústers basados en sus patrones de expresión en distintos tejidos, lo que sugiere que están sujetos a una expresión coordinada y compleja (Tsai *et al.*, 2009).

Se ha observado que en el proceso de la síntesis de almidón, también participan las enzimas glucan agua dicinasa (GWD) y la almidón fosforilasa; inicialmente consideradas como exclusivas del proceso de degradación de los gránulos. Se ha reportado que la fosforilación del almidón, regula el flujo de carbono hacia la síntesis de los gránulos y modula la expresión de los genes involucrados en este proceso (Su *et al.*, 2016).

Adicionalmente, diversos estudios han revelado la participación indirecta de otras proteínas. Dentro de ellas está la proteína dirigida al almidón 1 (PTST1), que en el endospermo de cebada interactúa con la GBSS1a y favorece la síntesis de amilosa (Zhong *et al.*, 2018). En endospermos de arroz se ha descubierto que la interacción de la almidón fosforilasa del plastidio (Pho1) con las BEs, es esencial para la iniciación de la síntesis de amilopectina (Nakamura *et al.*, 2017). En *Arabidopsis thaliana* las proteínas MFP1 y MRC son necesarias para dirigir a la proteína PTST2 dentro de los plastidios y facilitar la iniciación de la síntesis de los gránulos (Seung *et al.*, 2018).

SBDCP1 es un ejemplo de una proteína que pese a no tener una actividad enzimática, afecta el proceso de la síntesis de almidón. Esta proteína está localizada en los amiloplastos del endospermo de arroz y tiene un dominio de unión a almidón que interactúa con la SSIIIa, e inhibe su actividad de manera competitiva. Su presencia afecta el contenido de amilosa y el grado de polimerización de las cadenas de amilopectina (Cakir *et al.*, 2019).

Es importante mencionar que la síntesis de almidón no solo depende de las enzimas involucradas directamente con la síntesis del gránulo. Sino que también son relevantes las actividades de aquellas enzimas que metabolizan el carbono y cuyos productos derivan en la síntesis de ADP-glucosa, precursor directo de la síntesis de almidón.

2.2.2 La síntesis de ADP-glucosa, materia prima para la síntesis de almidón

En cloroplastos, la producción de ADP-glucosa está ligada al ciclo de Calvin-Benson a través de la conversión de la fructosa-6-fosfato (F6P) en glucosa-6-fosfato (G6P) catalizada por la enzima fosfogluco isomerasa (PGI). Posteriormente por la fosfoglucomutasa (PGM) que convierte a la G6P en glucosa-1-fosfato (G1P); y en un paso posterior, la ADP-glucosa-pirofosforilasa (AGPasa) cataliza la conversión de la G1P y ATP en ADP-glucosa y pirofosfato (Figura 5A). El ATP utilizado en esta reacción proviene de la fotofosforilación. Se estima que en *Arabidopsis thaliana* del 30 al 50% de los fotoasimilados son destinados a la síntesis de almidón (Stitt y Zeeman, 2012).

En tejidos no fotosintéticos el proceso es similar. Sin embargo, el carbono utilizado proviene de la sacarosa que se importa desde los tejidos fotosintéticos, y cuyo metabolismo en el citosol produce G6P y G1P. Ambos productos junto con ATP son transportados a los amiloplastos donde se usan como sustratos para la síntesis de ADP-glucosa (Van Harsseelaar, *et al.*, 2017). En este caso el ATP proviene de la mitocondria y su transporte hacia los plastidios ocurre en recambio con ADP (Figura 5B).

En endospermos de cereales, se estima que hasta del 95% de la actividad de AGPasa se localiza en el citosol (James *et al.*, 2003). En maíz (Kirchberger *et al.*, 2007) y trigo (Bowsher *et al.*, 2007) la ADP-glucosa se introduce a los plastidios por un translocador ADP-glucosa/ADP.

En endospermos de maíz también se ha visto que la sacarosa sintasa (SuSy) puede utilizar ADP en la hidrólisis de sacarosa para contribuir a la ADP-glucosa presente en el citosol (Li *et al.*, 2013). Hay autores que sugieren que este proceso también podría ocurrir en las hojas (Muñoz *et al.*, 2005). Esta propuesta puede explicar el porqué las mutantes en la actividad de fosfoglucomutasa de los plastidios (*pgm1*), pese a ser incapaces de producir ADP-glucosa a partir de G6P, tienen niveles bajos pero significativos de ADP-glucosa y almidón (Muñoz *et al.*, 2006).

Otros autores descartan la relevancia de esta vía, ya que en plantas de *Arabidopsis thaliana*, las mutaciones en *susy* no repercuten en los niveles de ADP-glucosa o de almidón presentes en las hojas (Barratt *et al.*, 2009). De hecho se ha sugerido que la síntesis de ADP-glucosa en los mutantes de *pgm1*, es producto de la importación de G1P al interior del plastidio (Fettke *et al.*, 2011).

Por otro lado, la expresión del translocador de G6P/Pi localizado en la membrana de los cloroplastos, aumenta en presencia de luz o en respuesta a un incremento en los niveles de azúcares. Todo esto muestra una fuerte interconexión entre las síntesis de almidón y la disponibilidad de azúcares en la célula, donde la distribución de hexosas fosfato dentro y fuera de los plastidios juega un papel muy importante (Fettke *et al.*, 2011).

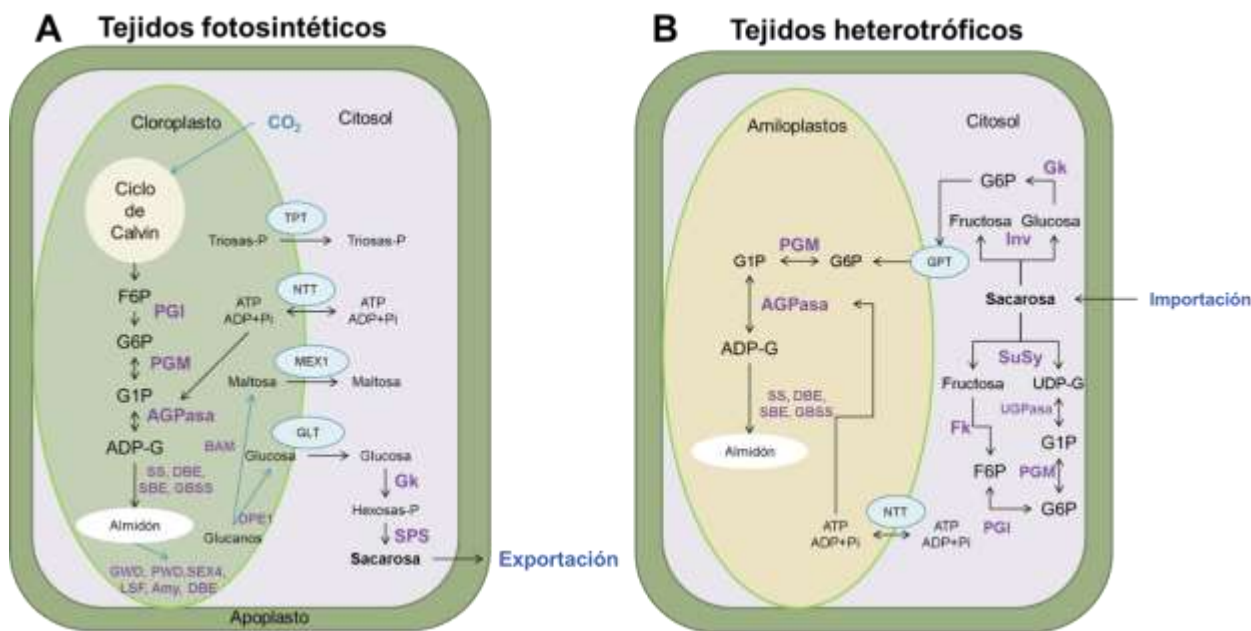


Figura 5. Diagrama del metabolismo de almidón. A. Enzimas y compuestos involucrados en la biosíntesis de almidón en tejidos fotosintéticos. B. Enzimas y compuestos involucrados en la biosíntesis de almidón en tejidos heterotróficos. Sacarosa sintasa (SuSy), invertasa (Inv), glucocinasa (Gk), fructocinasa (Fk), fosfoglucomutasa (PGI), fosfoglucomutasa (PGM), ADP-glucosa pirofosforilasa (AGP-asa), translocador de triosa-fosfato/fosfato (TPT), translocador de nucleótido (NTT), translocador de glucosa-6-fosfato/fosfato (GPT), transportador de maltosa (MEX1), transportador de glucosa (GLT). Imagen modificada de Van Harselaar, *et al.*, 2017.

2.2.3 Regulación de la actividad de la AGPasa

El hecho de que la sobre-expresión de AGPasa en tubérculos de papa incremente la cantidad de almidón (Stark *et al.*, 1992), pone de manifiesto su importancia en la regulación del proceso. Prueba de ello es que el coeficiente de control de esta enzima en el proceso de síntesis de almidón es de 0.35 (Morandini, 2009).

Esta enzima es un heterotetrámero que consta de dos subunidades pequeñas de 50 kD y dos subunidades grandes de 51 kD. Se ha reportado que las subunidades pequeñas tienen una función reguladora y catalítica, mientras que las subunidades grandes son regulatorias. Ambas subunidades son necesarias para que la enzima sea activa y estable (Salamone *et al.*, 2000). La actividad del complejo está regulada a nivel transcripcional, postranscripcional (alostérico) y postraduccional (Figura 6).



Figura 6. Regulación de la actividad de AGPasa. La enzima es un heterotetrámero que tiene dos subunidades pequeñas (S) de 50 kD cada una y dos subunidades grandes (L) de 51 kD. Las subunidades pequeñas tienen una función reguladora y catalítica, mientras que las subunidades grandes solo son regulatorias. La AGPasa está sujeta a regulación a nivel transcripcional, postranscripcional y postraduccional. En verde se muestran los factores que promueven la actividad de la AGPasa y en rojo los que la inhiben. Imagen modificada de Geigenberger (2011).

La expresión de las dos subunidades de AGPasa se incrementa por azúcares (Tiessen *et al.*, 2003) y se reduce por nitrato y fosfato (Scheible *et al.*, 1997, Nielsen *et al.*, 1998).

El factor de transcripción WRKY20 afecta positivamente la expresión del gen *ApL3* de *Arabidopsis thaliana* (que codifica para la subunidad grande de la AGPasa) y en *Ipomoea batatas* al que codifica para la subunidad pequeña de la AGPasa (Nagata *et al.*, 2012). Este factor de transcripción se induce fuertemente por sacarosa, lo que permite que la acumulación de almidón responda a cambios en el estado nutricional de la planta y a las limitaciones ambientales.

Se ha especulado que la regulación de la expresión de los genes de la AGPasa implica una coordinación entre tejidos fuente y tejidos demanda, que depende de su contenido de azúcares. Sin embargo, el mecanismo involucrado aún no es entendido del todo (Geigenberger 2011). Por otro lado, es importante considerar que los niveles de transcritos, a menudo no reflejan los niveles de la proteína, ni la actividad enzimática, como sucede en la raíz de *Beta vulgaris ssp altissima* que pese a expresar las enzimas PGM, AGPasa, SS y BE, almacena exclusivamente sacarosa (Turesson *et al.*, 2014).

La actividad de la AGPasa está sujeta a una regulación alostérica caracterizada por el efecto activador del 3-fosfoglicerato (3PGA), que promueve la síntesis de almidón, y por el efecto inhibidor del Pi (Tiessen *et al.*, 2002). En hojas de *Arabidopsis* cuando los niveles de fijación de carbono exceden la tasa de exportación, aumentan los niveles de intermediarios fosforilados y disminuye la concentración de Pi, provocando que aumente la relación 3PGA/Pi, así como la activación de la AGPasa y el incremento de la síntesis de almidón (Hendriks *et al.*, 2003). Este mecanismo de regulación es ampliamente aceptado. Sin embargo, la AGPasa de endospermos de trigo, no es sensible a estos efectores alostéricos, lo que indica que la importancia de este mecanismo de regulación es dependiente de cada tejido (Tetlow *et al.*, 2004).

Las condiciones redox también afectan la actividad de AGPasa. En tubérculos de papa se ha reportado que la reducción del puente disulfuro formado entre los residuos de cisteína 81 de las subunidades pequeñas, provoca un aumento en la actividad de la enzima junto con un incremento en la sensibilidad a la activación por 3PGA (Tiessen *et al.*, 2002; Hädrich *et al.*, 2012). La regulación redox de la actividad de AGPasa también ocurre en hojas. Hendriks y col. (2003) observaron que tanto la luz, como la sacarosa suministrada en obscuridad, promueven la ruptura del puente disulfuro entre las subunidades catalíticas. Los autores también mencionan que la forma reducida de la subunidad catalítica se incrementa durante el día, al igual que los azúcares presentes en la hoja.

Posteriormente, en un estudio realizado por Michalska y col. (2009), se identificó que una tiorredoxina reductasa C dependiente de NADPH, llamada NTRC, es la encargada de mediar la reducción de la AGPasa tanto *in vitro* como *in vivo*. Pese a esta evidencia también hay autores que señalan que la regulación redox de la AGPasa realmente tiene poco control sobre su actividad (Li *et al.*, 2012).

Ya mencionadas las características de las principales enzimas y compuestos involucrados en la síntesis de almidón, se procederá a integrar este conocimiento para describir los factores que regulan la síntesis de este polímero. Así como su función en distintos tejidos vegetales, lo cual es clave para entender el papel que tiene el almidón en la tolerancia al estrés.

2.2.4 Factores que regulan la síntesis de almidón

Como se mencionó anteriormente, el almidón transitorio se sintetiza durante el día y se degrada por la noche, lo que implica que su metabolismo está regulado por señales derivadas del ciclo de luz y obscuridad. En hojas de *Arabidopsis thaliana* se ha observado la activación redox de la AGPasa en presencia de luz y su inactivación en obscuridad (Stitt *et al.*, 2010). Sin embargo, la activación de la AGPasa también es una respuesta al aumento en el nivel de 3PGA en el estroma, que se observa durante el día como producto del ciclo de Calvin-Benson; y cuya concentración disminuye en la obscuridad (Gerhardt *et al.*, 1987).

De ahí que, tanto la alternancia como la duración de los periodos de luz y oscuridad, afecten profundamente el contenido de carbono en la planta. Para prevenir que durante la noche se presenten periodos de desabasto de carbohidratos, las plantas modifican las velocidades de síntesis y degradación del almidón en función de la duración de los periodos de iluminación y oscuridad (Gibon *et al.*, 2004).

La síntesis de almidón en las hojas también es afectada por la concentración de azúcares, producto del balance entre la actividad fotosintética y la exportación de carbono (Gibon *et al.*, 2004). Esta circunstancia es particularmente evidente en los tejidos no fotosintéticos (como los tubérculos de papa), donde la síntesis de almidón está sometida a un control que depende del contenido de azúcares, que a su vez, es un reflejo de la cantidad de sacarosa que exportan las hojas. La regulación redox de la AGPasa dependiente de azúcares, permite su activación en ausencia de luz (Hedriks *et al.*, 2003).

Por otro lado, la trehalosa-6-fosfato (T6P) además de ser el intermediario fosforilado de la síntesis de trehalosa, también es una molécula señalizadora que promueve la activación por redox de la AGPasa en respuesta a la sacarosa. Esta afirmación se desprende del hecho de que hojas de *Arabidopsis thaliana* que sobre-expresan a la T6P sintasa del citosol (TPS), muestran un incremento de la actividad de la AGPasa y de la síntesis de almidón; mientras que la expresión de la T6P fosfatasa tiene un efecto contrario (Kolbe *et al.*, 2005). Los niveles de T6P se incrementan en respuesta a aumentos en la concentración de sacarosa; sin embargo, todavía no se conoce cómo es que la T6P es transportada a los plastidios y como modula la activación redox de la AGPasa dependiente de la NTRC.

Un estudio reciente muestra que la TPS1 se localiza predominantemente en la zona de carga del floema, en las células guarda de las hojas, así como en la vasculatura de las raíces y en los meristemos apicales aéreos de *Arabidopsis thaliana*. El hecho de que la enzima se encuentre principalmente en el núcleo de las células de esos órganos, sugiere que su localización a los compartimientos subcelulares correctos y su fidelidad catalítica son necesarios para la apropiada señalización del estatus de la sacarosa por T6P (Fichtner *et al.*, 2020).

Es probable que la activación de AGPasa por T6P involucre la participación de la proteína cinasa relacionada a SNF1 (SnRK1), cuya actividad es inhibida por la T6P (Zhang *et al.*, 2009). Prueba de ello es que la represión de SnRK1 en embriones de chícharo reduce la cantidad de almidón, pese a que los niveles de T6P y azúcares se mantengan altos. Esto sugiere que SnRK1 y T6P se regulan negativamente y que ambos son necesarios para regular la actividad de la AGPasa (Radchuk *et al.*, 2010).

En tejidos heterotróficos la respiración mitocondrial provee el ATP requerido para la síntesis de almidón. Es por ello que en tubérculos y semillas, la inhibición de la respiración en respuesta a un decremento en la concentración de oxígeno, provoca una disminución en el estado energético de las células y por lo tanto en la velocidad de síntesis de almidón. Por el contrario, el aumento en la relación ATP/AMP incrementa la activación redox de la AGPasa. Sin embargo, todavía no se conoce el mecanismo involucrado (Geigenberger 2011).

Se ha reportado que durante el periodo de luz también ocurre la degradación del almidón. Indicando que la síntesis y degradación simultánea del almidón es necesaria para una correcta distribución del carbono, y que esa función es controlada en gran medida por la AGPasa (Baslam *et al.*, 2017; Fernandez *et al.*, 2017).

2.2.5 La función del almidón en los diferentes tejidos de las plantas

Se ha descrito que el almidón es una reserva de carbono. Sin embargo, no es la única alternativa; de hecho, las especies se pueden clasificar en las que tienen “hojas de almidón” (*Arabidopsis*, tabaco, tomate y papa), y las que tienen “hojas de azúcares” (arroz, cebada y trigo) por el tipo de compuestos que usan para acumular carbono en sus hojas. Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* cerca del 40% del carbono asimilado durante el periodo de luminoso se usa en la síntesis de almidón, la mayor parte del cual se utiliza durante la noche para satisfacer las demandas energéticas; por su parte, en las hojas de arroz (*Oriza sativa*), el almidón representa menos del 1% de su peso fresco, y su síntesis permite disminuir el exceso de azúcares y el efecto negativo que pueden tener en la actividad fotosintética (Dong *et al.*, 2019).

En los tejidos heterotróficos, el papel del almidón varía dependiendo de la etapa del desarrollo de los órganos. En frutos y embriones de leguminosas, el almidón es sintetizado en etapas tempranas de su desarrollo para aumentar la fuerza de demanda de carbono de esos órganos; posteriormente parte del almidón es degradado para favorecer la síntesis de otros componentes de las semillas como proteínas, lípidos y carbohidratos (Dong *et al.*, 2019).

La degradación del almidón que se acumula en los tallos de cereales provee azúcares que se usan en el llenado de los granos. Su presencia modula el ángulo vertical de los tallos de arroz y afecta la arquitectura de la planta. Existe evidencia de que en *Sorghum bicolor*, las enzimas involucradas tanto en la síntesis (AGPasa SS/LS, SS y BE) como en la degradación (GWD, BMY y DPE) del almidón en el tallo, tienen una expresión diferente a lo largo de la etapa reproductiva de la planta (Mckinley *et al.*, 2018). Esto indica que los tallos también pueden responder a las demandas energéticas de la planta sintetizando o degradando almidón cuando exista una demanda importante de carbono por parte de los frutos.

En la raíces, el almidón se acumula en la punta, participando en el gravitropismo y proporcionando energía y carbono para la búsqueda de agua y nutrientes (Baldwin *et al.*, 2013).

También existen variaciones intra-orgánicas en el papel del almidón. Por ejemplo, en las células guarda, el patrón de acumulación es muy distinto al de las células del mesófilo. Estas células lo acumulan durante la noche y lo degradan durante el día, lo que les permite aumentar la turgencia y abrir los estomas. Este mecanismo requiere de la acción sinérgica de la β amilasa (BMY1) y la α amilasas (AMY3). La actividad de dichas enzimas es regulada bajo estrés osmótico por ácido abscísico (ABA) (Thalmann *et al.*, 2016). En hojas de maíz se ha observado que la expresión del gen *CST1* (que codifica para un transportador de glucosa en las células subsidiarias), se induce bajo la deficiencia de carbono y se suprime por la acumulación de fotoasimilados, afectando la apertura de los estomas (Wang *et al.*, 2019).

2.2.6 El almidón y su función en la tolerancia al estrés

Se ha observado que en plantas de arroz, espinaca, tubérculos de papa y cebada sometidas a sequía, la actividad de AGPasa disminuye, mientras que la de SPS se incrementa, provocando que aumente la relación azúcares solubles/almidón; y se ha sugerido que los azúcares funcionan como osmoprotectores durante el déficit de agua (Villadsen *et al.*, 2005). El calor inhibe las actividades de AGPasa, GBSSI y BEII, y reduce la síntesis de almidón (Thitisaksakul *et al.*, 2012).

La sequía activa la expresión de genes que codifican a las enzimas AMY3, la α -glucano fosforilasa y la BMY, lo que acelera la degradación del almidón y la generación de azúcares solubles (Dong *et al.*, 2019), que pueden exportarse a los tejidos demanda o usarse en la síntesis de moléculas osmoprotectoras como la prolina (Zanella *et al.*, 2016).

El frío también promueve la degradación del almidón por medio de la activación de las isoformas de las BMY. En *Poncirus trifoliata* el factor de transcripción CBF1 (el cual es clave para la tolerancia al estrés por bajas temperaturas), dirige la expresión del gen de *BMY*, creando una conexión entre la degradación del almidón y la respuesta adaptativa al frío (Peng *et al.*, 2014).

En ese mismo sentido, se ha reportado que tanto mutantes de arroz en la β -amilasa BMY8, como líneas que sobre-expresan el factor de transcripción OsMYB30 (el cual inhibe la expresión de BMY2, BMY6 y BMY10), son incapaces de degradar almidón, y sensibles al frío (Kaplan y Guy, 2005, Lv *et al.*, 2017). La estrategia de tolerancia al estrés por frío basada en el aumento de la concentración de azúcares solubles a partir de la degradación del almidón, la complementan los transportadores plastídicos de azúcares (pSut), que bajo estas condiciones aumentan la exportación de azúcares fuera del cloroplasto (Patzke *et al.*, 2019).

2.3 La importancia de la vaina en el desarrollo de las semillas

Las vainas de los frutos de leguminosas, juegan un papel fundamental en el desarrollo de las semillas, además de protegerlas del ataque de plagas y patógenos, reciben y distribuyen los fotosintatos, provocando que se acumulen cantidades importantes de almidón en esta estructura (Coello y Martínez-Barajas, 2016).

Las vainas están constituidas de tres capas de células funcionales: el exocarpio, el mesocarpio y el endocarpio. El exocarpio es la capa más externa, su grosor es de una célula y contiene estomas que facilitan el intercambio gaseoso. El mesocarpio está compuesto por las células de la clorenquima que contienen cloroplastos; mientras que el endocarpio es la capa más interna (Sessions y Zambryski, 1995).

Después de la antesis, la vaina se convierte en un almacén de compuestos de nitrógeno y carbono, que son removilizados en etapas avanzadas del desarrollo de las semillas (Schiltz *et al.*, 2005). Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual los recursos se distribuyen entre las semillas. En *Arabidopsis*, las semillas se llenan de manera uniforme, mientras que en otras especies como los guisantes, las semillas que se encuentran al centro de la vaina son más grandes y pesadas que las que ocupan los extremos (Bennett *et al.*, 2011).

La actividad fotosintética de la vaina es relevante en el desarrollo de las semillas (Robinson y Hill 1999). Sin embargo, su importancia depende de la especie. En *Brassica napus* L. contribuye con hasta el 60% de los fotoasimilados demandados por la semilla (Diepenbrock, 2000); y se ha reportado que las vainas más grandes, tienen una mayor área fotosintética y producen semillas más pesadas (Li *et al.*, 2019).

En alfalfa la actividad fotosintética de vaina contribuye con el 25 al 48% del peso de las semillas (Wang *et al.*, 2016). En este caso, los productos fotosintéticos de la vaina también se exportan a tallos y raíces, y contribuyen al balance total de carbono en la planta, además de las hojas (Zhang *et al.*, 2017).

Las vainas de los frutos de *Phaseolus vulgaris* tienen una capacidad de fijación de CO₂ del 26% respecto a las hojas (Crookston *et al.*, 1974), la cual se reduce a medida que entra en senescencia (Wagstaff *et al.*, 2009). Se ha observado que parte del carbono fijado por la actividad fotosintética total de la planta se distribuye como almidón que se almacena en vainas y semillas. Esta concentración de almidón en la vaina de frijol es más alta en un genotipo tolerante a la sequía (Pinto Villa) que en el genotipo sensible (Canario 60) cuando se someten a un estrés por déficit de agua (Cuellar-Ortiz *et al.*, 2008).

Sin embargo, todavía no es clara la contribución neta de la actividad fotosintética de la vaina al carbono utilizado para la síntesis de almidón.

2.3.1 El almidón presente en la vaina de frijol podría ser una característica útil bajo condiciones de estrés

Previamente hemos observado que las vainas de los frutos de frijol acumulan cantidades importantes de almidón, y que existen grandes diferencias entre genotipos (Figura 7).

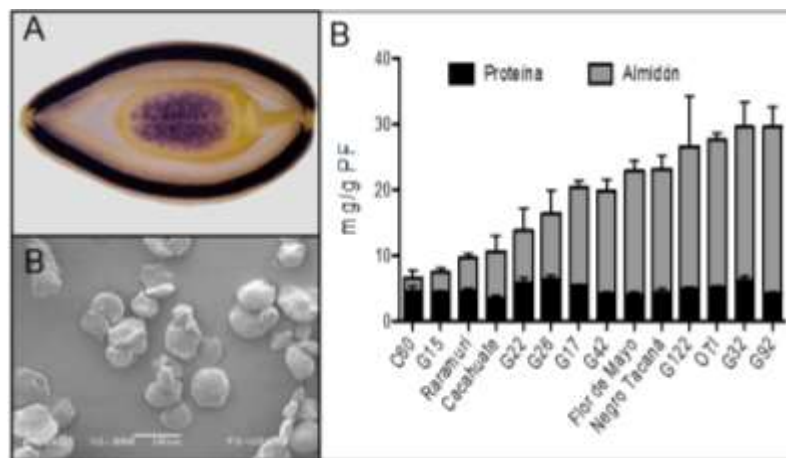


Figura 7. Almidón en vainas de frutos de frijol. A. Tinción con lugol en fruto de frijol (corte transversal). B. Microscopía de los gránulos de almidón en la vaina. C. Cuantificación de almidón y proteína total en vainas de diferentes genotipos de frijol. Las barras representan el promedio \pm DE, n=10 frutos. Resultados recientes del laboratorio, no publicados y transmitidos por comunicación personal.

El almidón que se acumula en las vainas de los frutos de frijol es una reserva de carbono que se usa en etapas posteriores al desarrollo de la semilla. Normalmente se moviliza entre los 25 y 30 días después de la antesis (DDA). Sin embargo, este proceso se acelera cuando hay restricción de fotosintatos (Coello y Martínez-Barajas, 2016) (Figura 8).

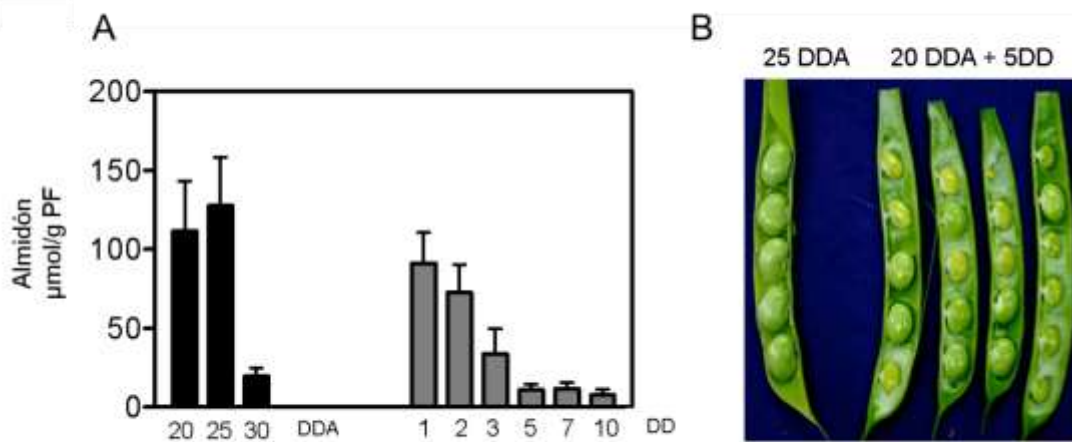


Figura 8. Efecto de la disponibilidad de nutrientes sobre el desarrollo de las semillas de frijol. A. Barras negras indican el contenido de almidón que normalmente se observa en vainas de frutos 20-30 DDA; Barras grises muestran la velocidad con la que se degrada el almidón cuando frutos de 20 DDA son cortados y analizados durante 10 días después de ser desprendidos de la planta (DD). Las barras representan el promedio $\pm\text{DE}$, $n=10$ frutos. B. Desarrollo de las semillas en plantas en frutos de 25 DDA cultivados en condiciones normales y en frutos que fueron cortados a 20 DDA y analizados 5 días después (20 DDA + 5 DD). Imagen tomada de Coello y Martínez-Barajas, 2016.

3 JUSTIFICACIÓN

Dada la importancia que el almidón acumulado en las vainas de los frutos de frijol podría tener en el desarrollo de las semillas, especialmente bajo condiciones de restricción de nutrientes, es necesario determinar las características de los procesos que participan en su síntesis y las bases moleculares de las diferencias que se observan entre genotipos.

4 HIPÓTESIS

La concentración de almidón que se acumula en las vainas de frutos de frijol es distinta entre genotipos debido a modificaciones que incrementan la fijación de carbono y su metabolismo hacia la síntesis de almidón.

5 OBJETIVO GENERAL

Analizar el papel de la actividad fotosintética de la vaina de los frutos de frijol sobre la acumulación de almidón en esta estructura y los procesos moleculares que podrían explicar las diferencias que se observan entre genotipos.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- 5.1.1** Determinar los niveles de almidón y carbohidratos solubles en vainas de frutos de 20 DDA en cuatro genotipos de frijol.
- 5.1.2** Analizar en extractos de vainas las actividades de enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos.
- 5.1.3** Estudiar cómo se distribuye en los frutos el carbono fotosintetizado por hojas y vainas.
- 5.1.4** Medir los niveles de clorofila en las vainas.
- 5.1.5** Analizar las características de los estomas de las vainas.
- 5.1.6** Investigar el efecto de la luz que incide en los frutos sobre el curso temporal de las concentraciones de azúcares en la vaina, y su impacto en el desarrollo de las semillas.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Se germinaron semillas de los genotipos disponibles en el laboratorio, G26, G15, OTI y Canario 60 (C60), luego las plantas se sembraron en agrolita y fueron regadas diariamente, alternando un día con agua y al siguiente con solución nutritiva Hoagland (Jones, 1982). Una vez que las plantas llegaron a su etapa reproductiva se etiquetaron las flores con la fecha de antesis, con el fin de establecer la edad de los frutos.

A los frutos de las edades seleccionadas se les retiraron las semillas; las vainas se cortaron en fragmentos pequeños, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C .

6.2 Extracción de azúcares solubles

El análisis de azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) y de almidón se realizó con el método reportado por Bernal *et al.*, 2005.

Muestras de vaina de aproximadamente 100 mg se molieron en un mortero con 1.0 mL de etanol al 80%, y se calentaron a 80°C por 20 minutos. Una vez que se enfriaron, se centrifugaron a 9600 g por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. El volumen se ajustó a 1.0 mL con etanol al 80%. Se agregaron 10 mg de carbón activado y después de mezclar, las muestras se centrifugaron a 9600 g por un minuto. El sobrenadante se utilizó para la cuantificación de azúcares solubles y el material insoluble en etanol al 80% se digirió para medir la cantidad de almidón.

6.3 Digestión de almidón

Los botones insolubles en etanol al 80% se resuspendieron en 1.0 mL de DMSO, se calentaron a ebullición por 30 minutos, y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se transfirieron 100 μ L de la suspensión a otro tubo con 450 μ L de buffer de digestión [100 mM NaOAc, pH 5.0; 5 mM CaCl₂; amilogucosidasas 16.5 U y α -amilasa 16 U], la digestión se llevó a cabo durante toda la noche a 55°C.

6.4 Cuantificación de azúcares solubles

La cuantificación se lleva a cabo por una serie de reacciones enzimáticas que involucran la fosforilación de las moléculas de glucosa y fructosa por la enzima hexocinasa. Posteriormente, la glucosa-6-fosfato se convierte en fosfogluconato en una reacción que es catalizada por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) utilizando NAD⁺ que en el proceso se reduce a NADH. El progreso de la reacción se sigue midiendo la absorción de NADH a una longitud de onda de 340 nm. En una segunda etapa, se agrega la enzima fosfoglucosa isomerasa (PGI) que convierte a la fructosa-6-fosfato en glucosa-6-fosfato. En una etapa final se agrega la enzima invertasa, que hidroliza una molécula de sacarosa en una de glucosa y otra de fructosa, las cuales son transformadas por las reacciones ya descritas (Bernal *et al.*, 2005) (Figura 9).

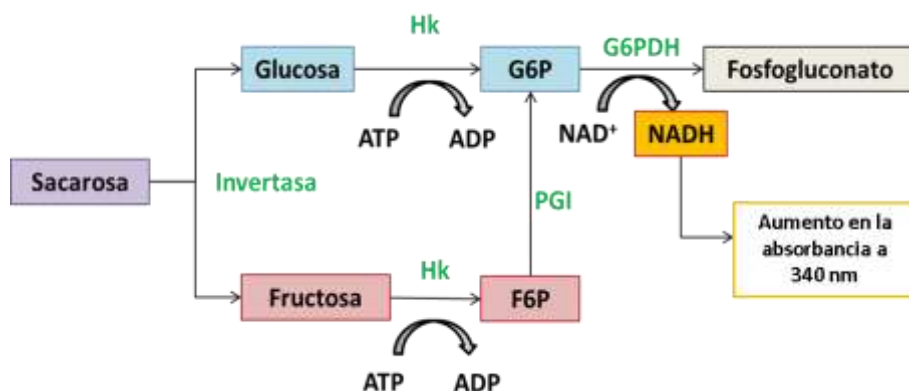


Figura 9. Ensayo enzimático usado para la cuantificación de azúcares solubles. La determinación de la concentración de los analitos se basa en la reducción del NAD⁺.

Para esta determinación se utilizó una placa de 96 pozos marca greiner. En cada pozo se depositaron 175 μL de mezcla de reacción [Hepes 100mM (pH 7.5); MgCl_2 50 mM; ATP 3 mM; NAD 0.9 M; Hexocinasa 0.2 U]; en seguida se agregaron 5 μL de cada muestra y se completó con H_2O hasta un volumen final de 200 μL .

Se registró la primer lectura a 340 nm y posteriormente, a cada muestra se le adicionaron 10 μL de cada una de las enzimas, las cuales se prepararon a una concentración de 0.1U/ μL , en el siguiente orden: G6PDH, PGI e Invertasa; Treinta minutos después de agregar cada enzima se midió la absorbancia a 340nm. Paralelamente se realizaron curvas patrón de glucosa y fructosa (ambas en un rango de 0 a 0.100 μmol) y de sacarosa (de 0 a 0.050 μmol). Para calcular la concentración de azúcares y expresarlos en $\mu\text{mol/g}$, los valores de las lecturas se interpolaron en las curvas patrón correspondientes y se tomó en cuenta el peso fresco o seco de las muestras de vainas.

6.5 Cuantificación de almidón

Para la cuantificación de almidón se tomaron 5 μL de las muestras digeridas y se siguió el procedimiento descrito anteriormente para la cuantificación de glucosa.

6.6 Extracción y cuantificación de proteínas

Por cada muestra, se pesó aproximadamente 1 g de tejido y se molió con 2 mL de solución amortiguadora de extracción (SAE) [Hepes 50 mM pH 7.5; MgCl_2 5 mM; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; DTT 2 mM; Glicerol 10% v/v; Tritón X-100 0.10% v/v; PVPP 33 mg/mL; 1 tableta de inhibidor de proteasas Cocktail Complete mini (Cat. No. 1836153001, ROCHE, E.E.U.U.)]. Después se centrifugó a 10000 g por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante en nuevos tubos.

La cuantificación se hizo en placas de ELISA; colocando 2.5 μL de muestra y luego 200 μL del reactivo de Bradford (Cat. No. B6916, SIGMA, E.E.U.U.), posteriormente se completó con agua para tener un volumen final de 220 μL . Después de 5 minutos se realizó la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Los valores se interpolaron en una curva patrón construida con BSA en un rango de 0 a 10 μg de proteína.

6.7 Determinación de actividades enzimáticas

6.7.1 Medición de la actividad de sacarosa sintasa (SuSy) e invertasa.

Para la medición de la actividad de SuSy se utilizaron los extractos proteicos mencionados anteriormente. Se usaron 400 μg de proteína total por muestra, 100 μL de mezcla de reacción 2X [Hepes 100 mM pH 7.5; MgCl_2 2 mM; ATP 1 mM; NAD^+ 1 mM; UDP 5 mM; sacarosa 400 mM; Hexocinasa 2 U; G6PDH 2 U; PGI 2 U; BSA 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$], y la cantidad de SAE necesaria para completar un volumen de 200 μL . Posteriormente se midió la absorbancia a 340 nm monitoreando la formación de NADH durante 10 min. La actividad enzimática se determinó con el coeficiente de extinción molar del NADH que es $6,22 * 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

La actividad de invertasa se midió siguiendo el mismo procedimiento pero sin UDP en la mezcla de reacción. Método basado en Doehlert *et al.*, 1988.

6.7.2 Medición de la actividad de glucocinasa

La actividad se cuantificó utilizando 500 μg de proteína y 40 μL de mezcla de reacción 5X [Hepes 150 mM pH 7.5; MgCl_2 5 mM; EDTA 3 mM; KCl 50 mM; ATP 5 mM; NAD^+ 5 mM; glucosa 25 mM; G6PDH 7.5 U; BSA 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$], luego se adicionó la cantidad necesaria de SAE para completar un volumen de 200 μL . Posteriormente se midió de forma continua durante 10 min, el aumento en la absorbancia a 340 nm.

6.7.3 Medición de la actividad de fructocinasa

De forma similar a la determinación de la glucocinasa, se utilizaron 500 µg de proteína y 40 µL de mezcla de reacción 5X [Hepes 150 mM pH 7.5; MgCl₂ 5 mM; EDTA 3 mM; KCl 50 mM; ATP 5 mM; NAD⁺ 5 mM; fructosa 5 mM; G6PDH 7.5 U; PGI 7.5 U; BSA 25 µg/µL]; completando con SAE a 200 µL. Después se midió el aumento en la absorbancia a 340 nm durante 10 minutos. Métodos basados en Martínez-Barajas *et al.*, 1997.

6.7.4 Medición de la actividad de PGM

En este caso se utilizaron 80 µg de proteína por muestra y 50 µL de mezcla de reacción 2X [Hepes 100 mM pH 7.5; MgCl₂ 10 mM; NAD⁺ 2 mM; G1P 10 mM; G1,6bP 60 µM; G6PDH 2 U; BSA 10 µg/µL], completando a un volumen de 100 µL con SAE. Posteriormente se midió el incremento en la absorbancia a 340 nm por 10 minutos. Método basado en Doehlert *et al.*, 1988.

6.7.5 Medición de la actividad de PGI

Se requirió de 250 µg de proteína por muestra y 20 µL de mezcla de reacción 5X [Hepes 250 mM pH 7.5; MgCl₂ 25 mM; NAD⁺ 5 mM; F6P 25 mM; G6PDH 5 U; BSA 25 µg/µL], completando a 100 µL con SAE. Después se midió el aumento en la absorbancia a 340 nm por 10 minutos. Método basado en Doehlert *et al.*, 1988.

6.7.6 Medición de la actividad de SPS

Para este ensayo se emplearon 150 µg de proteína por muestra, 25 µL de mezcla de reacción 2x [Hepes 100 mM pH 7.5; MgCl₂ 5 mM; F6P 20 mM; UDP-Glucosa 20 mM; G6P 80 mM; DTT 5 mM; BSA 10 µg/µL] y completando a un volumen de 50 µL con SAE. La mezcla se incubó a 30°C por 10 minutos y la reacción se detuvo agregando 50 µL de KOH al 30% p/v. Acto seguido, se calentó a 92°C por 10 minutos para luego centrifugar a 10000 g por 10 minutos.

El sobrenadante obtenido se colocó en un tubo nuevo con 1 mL de una solución de antrona al 0.14% p/v en ácido sulfúrico al 85%. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y se realizó la lectura de la absorbancia a 625 nm en celdas de vidrio. Para determinar la actividad de esta enzima se hizo una curva patrón de sacarosa en un rango de 0 a 0.125 μ moles. Método basado en Zhang *et al.*, 2011.

6.7.7 Medición de la actividad de AGPasa

Se utilizaron 300 μ g de proteína total por muestra y 25 μ L de mezcla de reacción 5X [Hepes 250 mM pH 7.5; $MgCl_2$ 75 mM; ATP 20 mM; G1P 20 mM; 3PGA 25 mM; DTT 25mM; BSA 25 μ g/ μ L]. Se completó con SAE a un volumen de 125 μ L y se incubó a 37°C por 30 min. La reacción se detuvo calentando a ebullición por 2 minutos. Finalmente el PPI liberado se cuantificó agregando 150 μ L del reactivo (Cat. No. P7275, SIGMA, E.E.U.U.) [Imidazol x HCl 45 mM pH 7.4; citrato 5 mM; EDTA 0.10 mM; Mg^+ 2 mM; Mn^{2+} 0.2 mM; Co^{2+} 0.02 mM; β -NADH 0.8 mM; F6P 12 mM; BSA 5 mg/mL; estabilizador de azúcar 5 mg/mL; PPI-PFK 0.5 unidades/mL; aldolasa 7.5 unidades/mL; GDH 5 unidades/mL; TPI 50 unidades/mL].

Después de una incubación de 40 minutos a 30°C se midió la absorbancia a 340 nm. Los resultados se interpolaron a una curva patrón de PPI que va de 0 a 0.1 μ moles. Método basado en Seferoglou *et al.*, 2013.

6.8 Fijación de $^{14}\text{CO}_2$ y distribución de fotosintatos

Con el fin de analizar la actividad fotosintética de vainas y hojas, así como la distribución en el fruto de los fotosintatos producidos por ambas estructuras, se realizó un ensayo de incorporación de $^{14}\text{CO}_2$. Para ello se usaron frutos de 16 DDA y las hojas más cercanas a los frutos. Se utilizaron 5 μCi de $^{14}\text{CO}_2$ liberado al reaccionar 200 μL de ácido láctico 3M con 5 μL de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ en un tubo Eppendorf colocado dentro de la bolsa de plástico transparente que encerraba a las hojas o las vainas (Figura 10). Después de 2 horas la producción de $^{14}\text{CO}_2$ se detuvo agregando 800 μL de KOH al 30% y se retiró la bolsa de plástico. Se dió una hora para que los fotosintatos se distribuyeran y pasado ese tiempo los frutos se cosecharon. Los frutos se pesaron y se disectaron; las vainas y semillas se guardaron por separado. El material se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C .

Para el genotipo C60 se colectaron 11 frutos para analizar la distribución de la marca incorporada en las hojas y 13 para el estudio de la distribución de la marca incorporada por los frutos; en el caso del genotipo G26, se cosecharon 14 frutos para estudiar la distribución de la marca incorporada en las hojas y 12 para evaluar el reparto de la marca incorporada en el fruto.

Para cuantificar la cantidad de ^{14}C en las vainas y semillas de los frutos se hicieron extractos etanólicos, moliendo 200 mg de vaina se con 1.25 mL de etanol al 80%. Para medir la incorporación total, se tomaron 100 μL de la suspensión y se colocaron en viales con 3 mL de líquido de centelleo y se leyó el número de las cuentas por minuto (CPM). El material restante se calentó a 80°C por 30 min y se centrifugó a 9600 g por 5 min. Se tomaron 100 μL del sobrenadante para determinar la cantidad de ^{14}C incorporada en la fracción de azúcares solubles. El material insoluble en etanol al 80% se resuspendió en 500 μl de agua y se calentó a 80°C por 4 h. Después se agregaron 250 μl de acetato de sodio (100 mM, pH 5.0), conteniendo el coctel de enzimas usado para la degradación de almidón. Después de mezclar, las muestras se incubaron toda la noche a 50°C . Al día siguiente, los tubos se centrifugaron a 9600 g por 5 min y se usaron 100 μL del sobrenadante para determinar la cantidad de ^{14}C incorporada en almidón.

El material insoluble se resuspendió en 500 μl de acetato de sodio (pH 7.5) y 5 mM de acetato de calcio conteniendo 100 U de pronasa (de *Streptomyces griseus*) y se incubó a toda la noche. Al día siguiente, los tubos se centrifugaron a 9600 g por 5 min y se usaron 100 μL del sobrenadante para determinar la cantidad de ^{14}C incorporada en la fracción de proteínas. El material insoluble se resuspendió en líquido de centelleo para medir la incorporación de ^{14}C en otros materiales. Cada uno de los frutos se analizó por triplicado.

Para el análisis de las semillas se molieron 100 mg de tejido con 500 μL de etanol al 80%; y se tomaron 100 μL de la suspensión para el conteo. En este caso, cada fruto se analizó por duplicado.

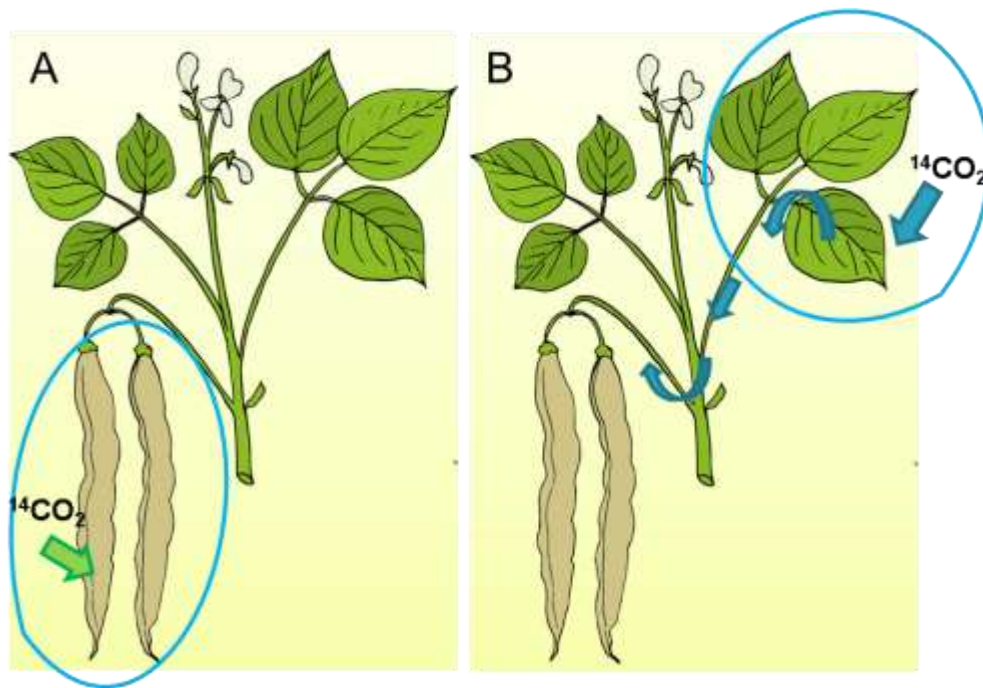


Figura 10. Análisis de la distribución de carbono fotosintetizado. Se utilizó una marca de $^{14}\text{CO}_2$ en frutos de 16 DDA (A) y en las hojas más cercanas a los frutos (B).

6.9 Inmunodetección

Este procedimiento se basó en los métodos reportados por (Bernal *et al.*, 2005). Se utilizaron geles de poliacrilamida SDS al 12% cargados con 10 µg de proteína. Las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF, las cantidades de enzima fueron evaluadas por western blot.

La membranas se bloquearon con leche descremada al 5% (disuelta en TBS-T) por dos horas a temperatura ambiente con agitación suave. Pasado ese tiempo, se retiró la leche y se adicionó el anticuerpo primario anti AGPasa-LS (dilución 1:20000) o anti Rubisco (dilución 1:30000 en TBS-T) y se incubó por 12 horas a 4°C con agitación suave. Posteriormente se hicieron 4 lavados de 10 min con Buffer TBS-T [Tris-Base 20 mM pH 7.5; NaCl 150 mM; Tween-20 0.1%]. Después se adicionó el anticuerpo secundario diluido 1:20000 disuelto en TBS-T (anti conejo acoplado a peroxidasa de rábano picante Cat. No. A0545, SIGMA, E.E.U.U.) y se incubó por una hora a temperatura ambiente con agitación suave.

Nuevamente, se hicieron 4 lavados de 10 min cada uno con Buffer PBS-T, después de los cuales la membrana se reveló utilizando el sustrato Immobilon Western HRP (Cat. No.WBKLS0100, Millipore, E.E.U.U.). La señal se visualizó, en el fotodocumentador Chemidoc (BIORAD) usando un tiempo de exposición de 2 segundos.

6.10 Cuantificación del contenido de clorofilas

Este análisis se realizó mediante la modificación del método reportado por (Makeen *et al.*, 2007). El contenido de clorofilas en vainas se determinó utilizando el método colocando alrededor de 50 mg de tejido molido en nitrógeno líquido en tubos con 1 mL de acetona al 90% (90 mL de acetona con 10 mL de Tris 0.2 M, pH 7.5) en agitación rotatoria a 4°C en oscuridad durante 48 h. Después de centrifugar 10,000 g, la absorbancia del sobrenadante se midió a las longitudes de onda de 663, 647 y 470 nm. Para el cálculo de la concentración se utilizaron las siguientes ecuaciones.

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g/mL}) = 12.25 A_{663} - 2.79 A_{647}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g/mL}) = 21.50 A_{647} - 5.10 A_{663}$$

$$\text{Clorofila a+b } (\mu\text{g/mL}) = 7.15 A_{663} + 18.71 A_{647}$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g/mL}) = [1000 A_{470} - 1.82 (\text{Chl a}) - 85.02 (\text{Chl b})]/198$$

6.11 Cuantificación del flujo de sacarosa hacia los frutos

La cantidad de sacarosa que reciben los frutos se evaluó colectando el fluido que reciben en tubos con 1 mL de EDTA 20 mM, una vez que los frutos fueron cortados. La colecta de sacarosa se realizó por cuatro horas. Modificación del método descrito por Araki *et al.*, 1997.

6.12 Observación de estomas

Se obtuvieron impresiones de la superficie exterior de las vainas utilizando pegamento de secado rápido (Kola Loka[®] en su presentación de brocha), el cual se untó sobre la superficie de la vaina dejándolo secar por 3 minutos. La capa fina generada se retiró utilizando una cinta adhesiva transparente que luego se montó sobre un portaobjetos para su observación al microscopio óptico utilizando el objetivo 40x/0.60.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Cuantificación de los carbohidratos presentes en la vaina de diferentes genotipos de frijol

Como punto de partida se realizó la cuantificación de la concentración de azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) y de almidón en las vainas de frutos de 20 DDA de los 4 genotipos de frijol disponibles en el laboratorio. Este resultado permitió distinguir una relación inversa entre las cantidades de azúcares solubles y almidón. Siendo G26 el genotipo con la concentración de almidón más alta y el contenido de azúcares solubles más bajo, mientras que en C60 se observa lo contrario (Figura 11). Debido a este contraste, los genotipos C60 y G26 fueron seleccionados para realizar los experimentos que se describen posteriormente.

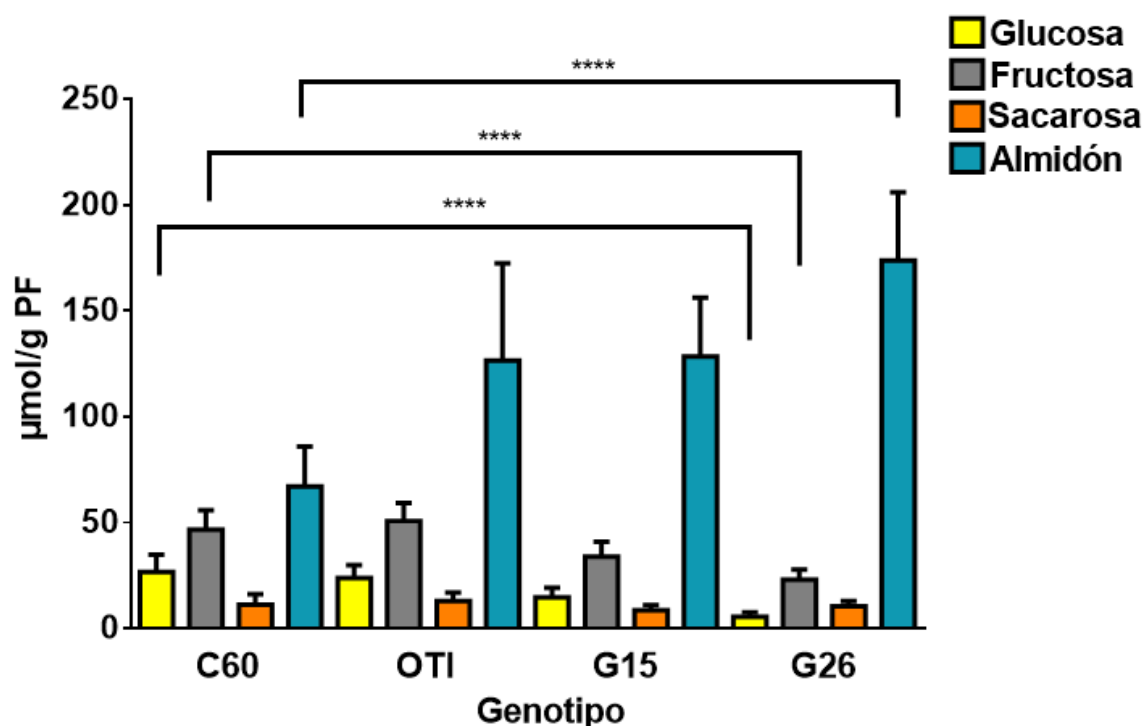


Figura 11. Contenido de carbohidratos en vainas de frutos de frijol de 20 DDA en diferentes genotipos. Las barras representan el promedio \pm DE, n=15 frutos. **** indica diferencia significativa ($P < 0.001$) según la prueba de U de Mann-Whitney.

7.2 Análisis de las actividades enzimáticas

Con la finalidad de conocer si las diferencias en la distribución de los carbohidratos presentes en las vainas de los genotipos G26 y C60 a 20 DDA, son producto de cambios en la forma de metabolizar el carbono, se analizaron las actividades de las siguientes enzimas: fosfoglucosa isomerasa (PGI), fosfoglucomutasa (PGM), ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), sacarosa fosfato sintasa (SPS), sacarosa sintasa (SuSy), invertasa (Inv), fructocinasa (Fk) y glucocinasa (Gk); las cuales de acuerdo con la Figura 12, están involucradas en el proceso de la síntesis de almidón.

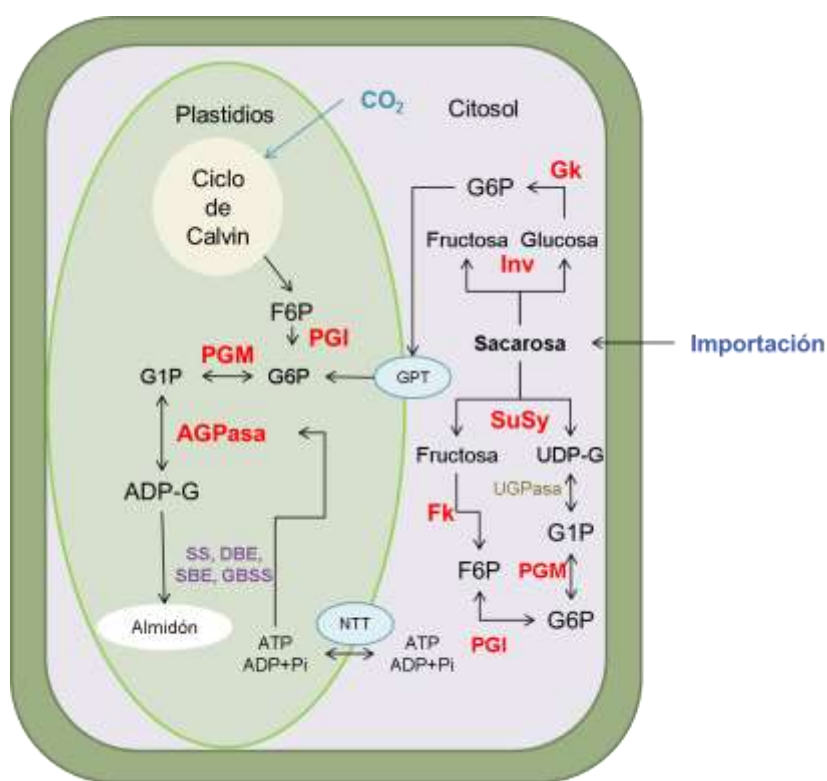


Figura 12. Enzimas y compuestos involucrados en la biosíntesis del almidón. La actividad de las enzimas se analizó en un extracto total de proteínas. Las enzimas analizadas son las que se encuentran en color rojo. Imagen modificada de Van Harsseelaar, *et. al.*, 2017.

En la Figura 13, se puede observar que no hay diferencias entre genotipos respecto a las actividades de las enzimas SuSy, SPS, PGM y AGPasa. Mientras que las actividades de Invertasa y Fk fueron mayores en C60, y las de PGI y Gk fueron más elevadas en G26.

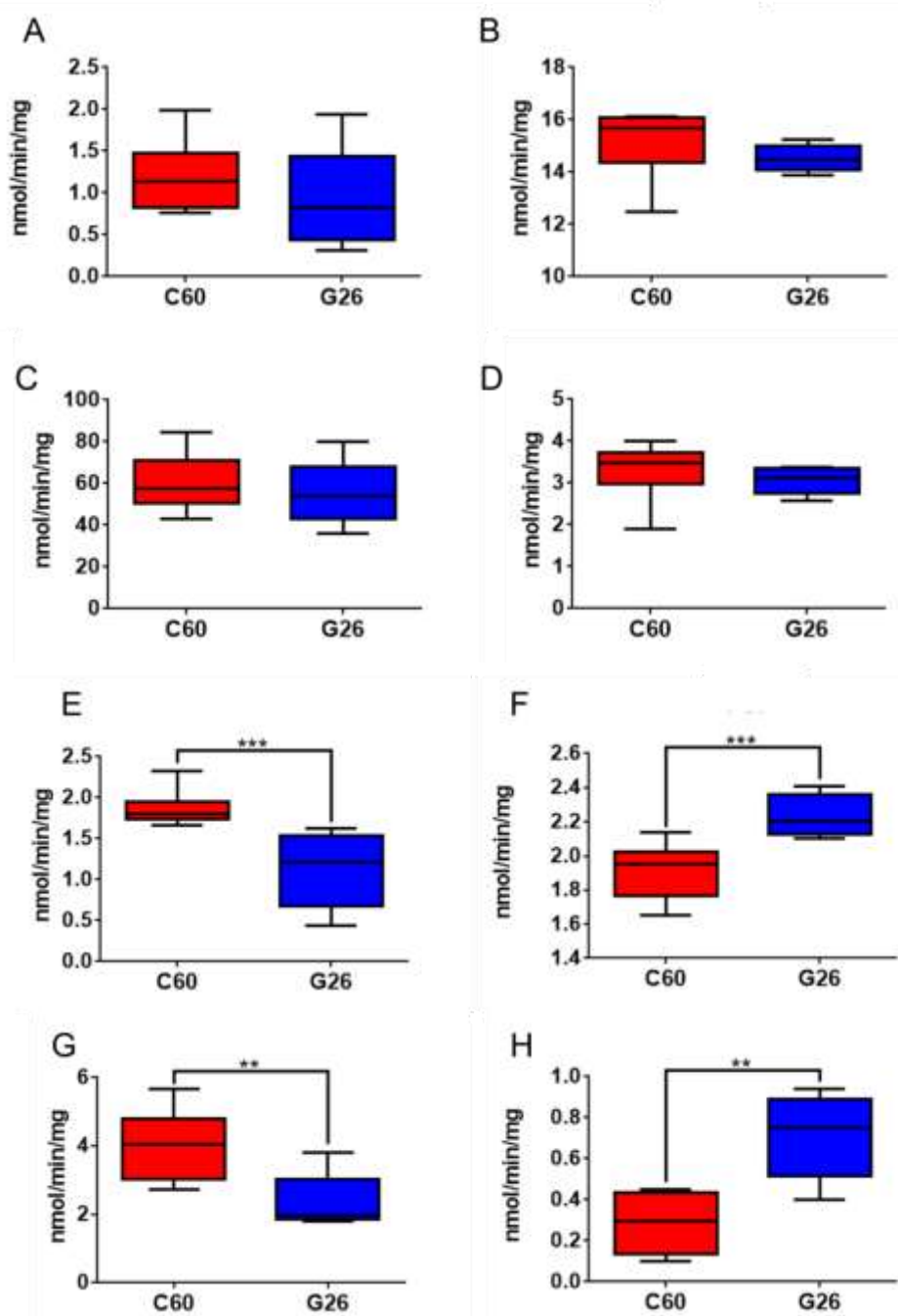


Figura 13. Actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de carbono en vainas de frutos de frijol. Los valores son resultado del análisis de 4 vainas de 20 DDA por genotipo. A. Actividad enzimática de la AGPasa. B. PGM. C. SPS. D. SuSy. E. invertasa. F. PGI. G. Fk. H. Gk. ** y *** indican diferencias significativas ($P < 0.01$ y $P < 0.005$, respectivamente) según la prueba de U de Mann-Whitney.

Estos resultados no muestran una relación evidente con el hecho de que las vainas del genotipo G26 contengan más almidón que las del C60. Las actividades de enzimas clave para la síntesis de ADP glucosa (AGPasa y la PGM), son similares en ambos genotipos. El hecho de que la actividad de AGPasa haya sido identificada como una de las que mayor control ejerce sobre la síntesis de almidón sugiere que la base de la diferencia en la cantidad de almidón presente en las vainas de los genotipos analizados no está a ese nivel (Morandini, 2009). Tampoco hay diferencia en las actividades de SuSy y SPS. Sin embargo, las vainas de C60 tienen una actividad de invertasa más alta, que podría contribuir a que las cantidades de glucosa y fructosa sean más elevadas. El hecho de que la cantidad de fructosa sea considerablemente más alta que la de glucosa; sugiere que la actividad de fructocinasa es insuficiente para metabolizar eficientemente la fructosa disponible, y que la mayor actividad que se observa en C60 no es suficiente. Por otro lado, las vainas de G26 tienen una mayor actividad de Gk, la cual podría impulsar el flujo de carbono hacia la producción de G6P y posteriormente convertirla en G1P y ADP-glucosa, para favorecer la síntesis de almidón.

Se ha reportado que el transporte de glucosa fosforilada (G6P y G1P) puede contribuir a la síntesis de almidón (Fettke *et al.*, 2011). Para confirmar que algo similar podría estar pasando en las vainas de los frutos de frijol será necesario medir la actividad de esos transportadores.

Por otro lado, es probable que las diferencias en el contenido de almidón en las vainas de los genotipos G26 y C60, se deban a la disponibilidad de los fotoasimilados provenientes de hojas y de las vainas.

7.3 Distribución de ^{14}C en frutos de frijol

Con el fin de explorar si las diferencias en el contenido de carbohidratos de las vainas de ambos genotipos estaban relacionadas con la disponibilidad de los fotosintatos, hojas y frutos se incubaron en un medio con $^{14}\text{CO}_2$ (Figura 10), y se evaluó la contribución de ambos órganos.

Los resultados indican que no hay diferencia entre genotipos en cuanto a la cantidad de marca presente en las vainas cuando la hoja más próxima a éste se incubó en un ambiente con $^{14}\text{CO}_2$. El análisis también muestra que la actividad fotosintética de los frutos del genotipo G26 es superior a la observada en C60 (Figura 14).

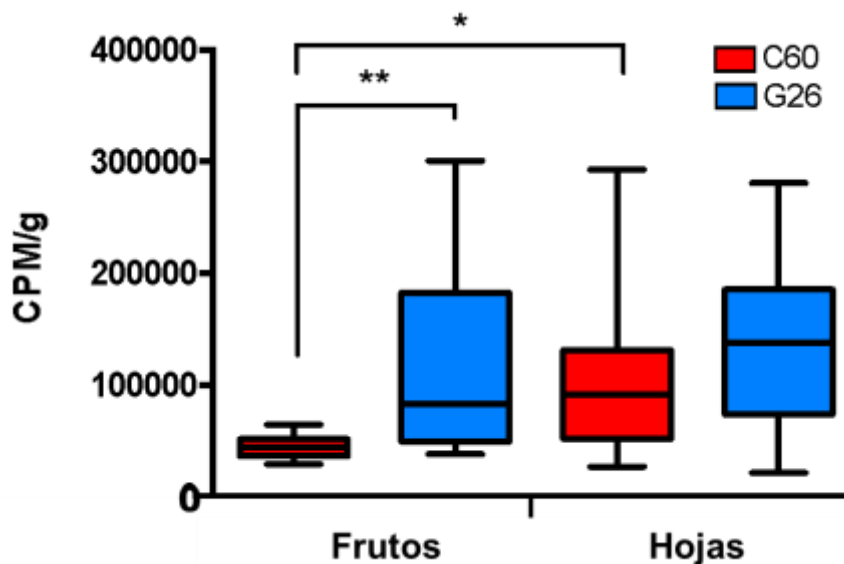


Figura 14. Análisis de la cantidad de ^{14}C presente en las vainas producto de la actividad fotosintética de frutos y hojas. En el genotipo C60 se analizaron 11 frutos para evaluar la contribución de la actividad fotosintética de las hojas y 13 para analizar la de los frutos; en el caso del genotipo G26, se usaron 14 frutos para estudiar la contribución de la actividad fotosintética de las hojas y 12 para evaluar la de los frutos. Los valores son el promedio de ese número de repeticiones. * y ** indican diferencias significativas ($P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente) según la prueba U de Mann-Whitney.

El análisis de la distribución de la marca presente en las vainas muestra diferencias importantes que dependen tanto del genotipo, como del origen de los fotoasimilados: en el C60 más del 70% del carbono asimilado por las hojas se encuentra en la fracción de azúcares solubles. En el genotipo G26 esa fracción es cercana al 50%. En cambio, cuando la marca proviene de la actividad fotosintética del fruto, en ambos genotipos se reduce la incorporación en la fracción de azúcares solubles y se incrementa la proporción presente en almidón, proteína y paredes celulares (Figura 15).

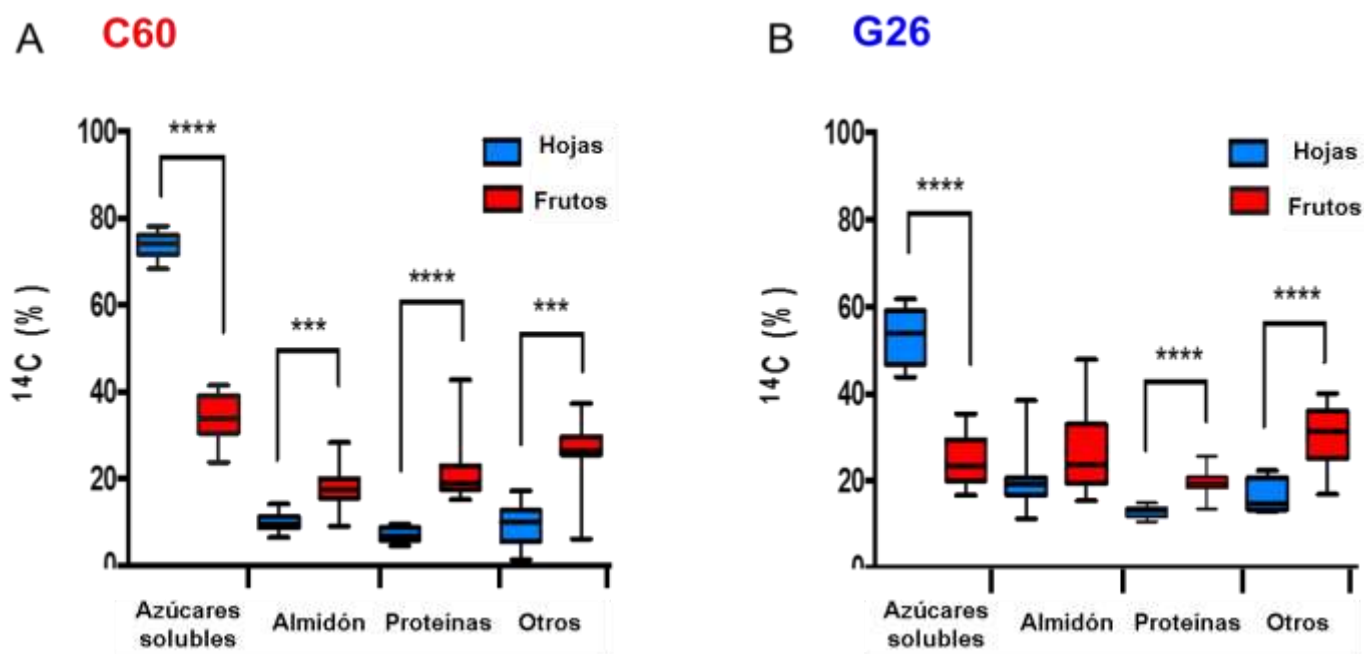


Figura 15. Distribución de ^{14}C en vainas de frutos de frijol producto de la actividad fotosintética de las hojas y de los frutos. La incorporación de ^{14}C en azúcares solubles, almidón y proteínas a partir de la actividad fotosintética de la hoja más próxima al fruto (símbolos azules) y de los frutos (símbolos rojos) de 16 DDA de los genotipos C60 (A) y G26 (B). Para el genotipo C60 se colectaron 11 frutos para analizar la distribución de la marca incorporada en las hojas y 13 para la incorporación en los frutos; en el caso del genotipo G26, se cosecharon 14 frutos para estudiar las distribución de la marca incorporada en las hojas y 12 para evaluar el reparto de la marca incorporada en el fruto. Los valores son el promedio de ese número de repeticiones. *** y **** indica diferencias significativas ($P < 0.005$ y $P < 0.001$, respectivamente) según la prueba U de Mann-Whitney.

También se analizó la distribución de la marca entre vaina y semillas. En la Tabla 2 se aprecia que en ambos genotipos el $^{14}\text{CO}_2$ que se asimila en las hojas se transporta más rápidamente a las semillas (~30%) que el asimilado en las vainas (~3 %).

Tabla 2. Análisis de la distribución de ^{14}C en vainas y semillas incorporado como $^{14}\text{CO}_2$ por frutos y hojas de frijol.

Genotipo	Incorporación de ^{14}C	Vaina (%)	Semilla (%)
Canario 60	Fruto	96.5±1.4	3.5±0.98
	Hoja	71.2±17.0	28.8±17.0
G26	Fruto	98.5±1.3	2.5±1.2
	Hoja	72.5±11.8	29.5±9.2

Estos resultados en conjunto muestran que independientemente del origen de los fotosintatos, el genotipo G26 es más eficiente para sintetizar almidón en la vaina y que la actividad fotosintética del fruto puede contribuir de manera importante a la cantidad de almidón acumulado en esa estructura. Esta propuesta es consistente con el hecho de que los productos de la actividad fotosintética del fruto se movilizan más lentamente a las semillas que los que provienen de la actividad fotosintética de las hojas.

7.4 Efecto del desarrollo de los frutos sobre la actividad fotosintética de la vaina

En un experimento adicional se investigó el efecto del desarrollo sobre la actividad fotosintética de los frutos. En la figura 16A se puede apreciar que la incorporación de carbono aumenta conforme avanza la edad de los frutos. En C60 el valor más alto se observa a los 25 DDA; mientras que los frutos de G26 fijan más carbono en 20 DDA. El análisis de la distribución, muestra que la mayor parte del carbono fijado por la vaina permanece en este órgano (Figura 16B), y que a medida que va pasando el tiempo, el transporte hacia las semillas va incrementando (Figura 16C). La expresión relativa (%) de la distribución de los productos de la actividad fotosintética del fruto permite ver esta distribución con más claridad (Figura 17)

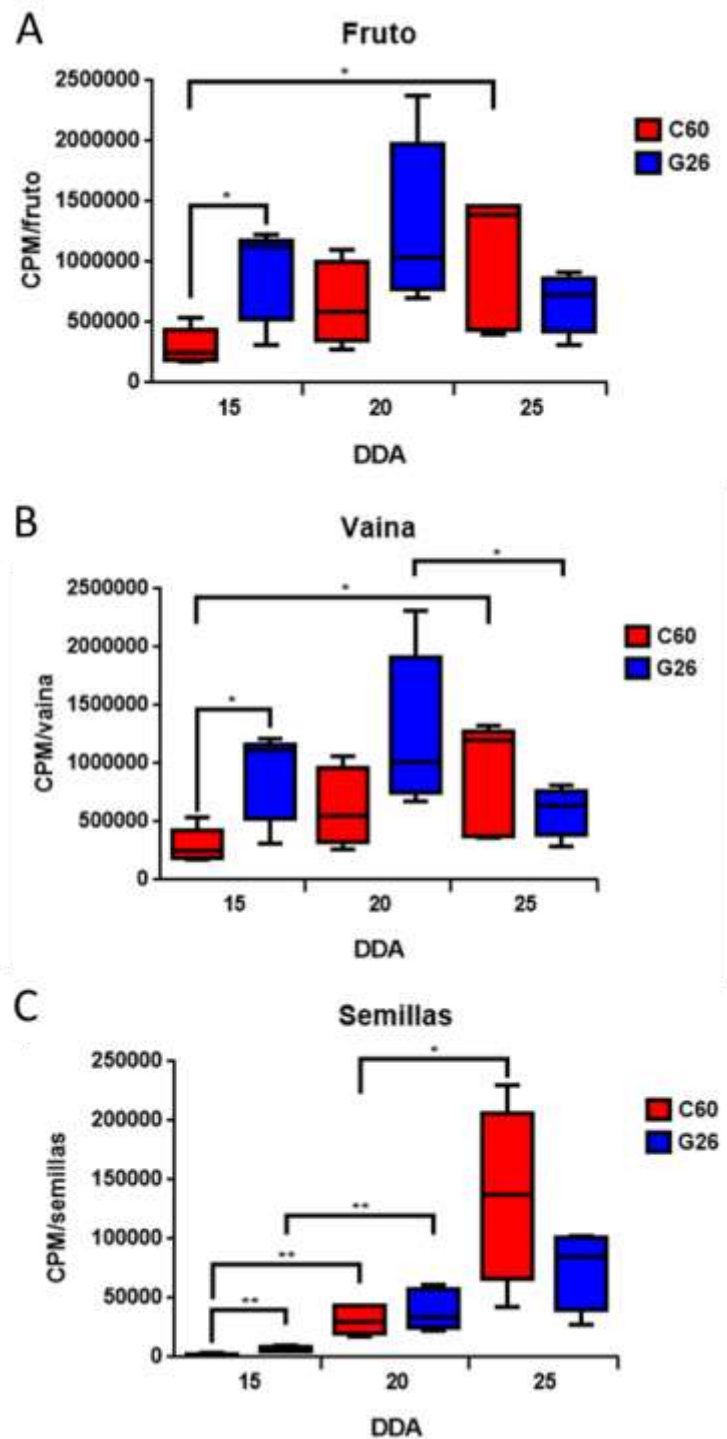


Figura 16. Análisis de la actividad fotosintética de los frutos durante su desarrollo. A, Incorporación de ^{14}C en los frutos. Distribución de la marca en vainas (B) y semillas (C). Los valores son resultado del análisis de 15 frutos por cada genotipo. * y ** indican diferencias significativas ($P < 0.05$ y $P < 0.001$, respectivamente) según la prueba U de Mann-Whitney

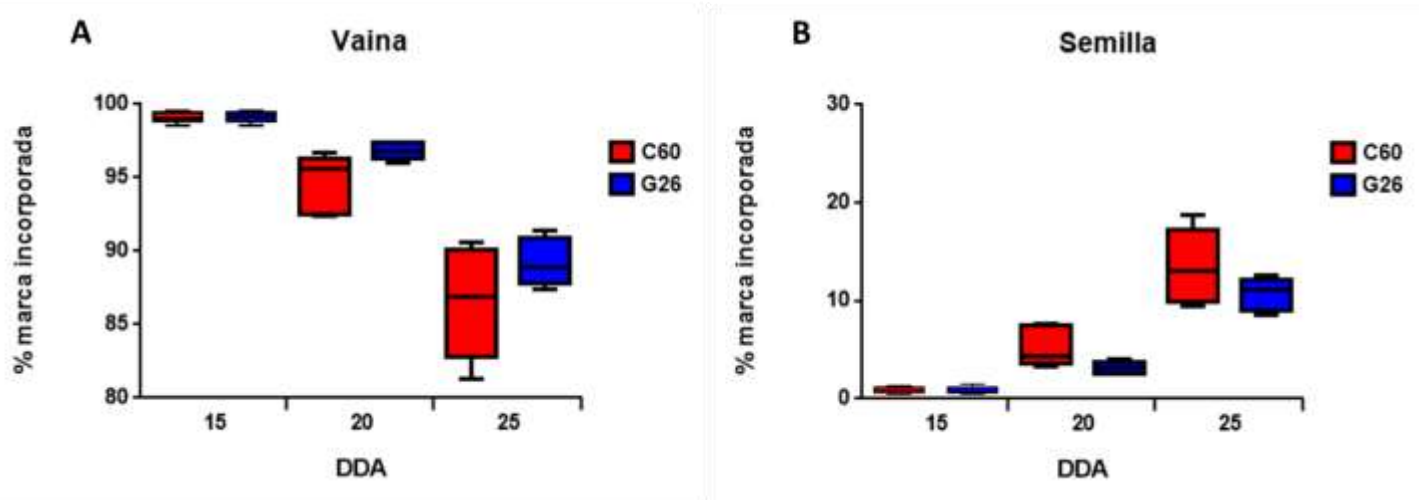


Figura 17. Porcentaje de distribución de ^{14}C en la vaina y semillas a través del tiempo, producto de la actividad fotosintética de los frutos. A. Porcentaje de incorporación de ^{14}C en la vaina de C60 (Rojo) y G26 (Azul). Porcentaje de incorporación de la marca en semillas (B) de ambos genotipos. Los valores son resultado del análisis de 15 frutos por cada genotipo en cada DDA indicado.

7.5 Análisis de la actividad fotosintética de la vaina

Los resultados descritos anteriormente muestran la necesidad de conocer las causas de las diferencias en la actividad fotosintética de los frutos. Con ese propósito se midieron los niveles de clorofila, la cantidad y actividad de la Rubisco, así como la cantidad y apertura de los estomas presentes en el exocarpio.

La cuantificación de clorofilas en las vainas de frutos de 20 DDA mostró que no hay diferencias entre genotipos (Figura 18).

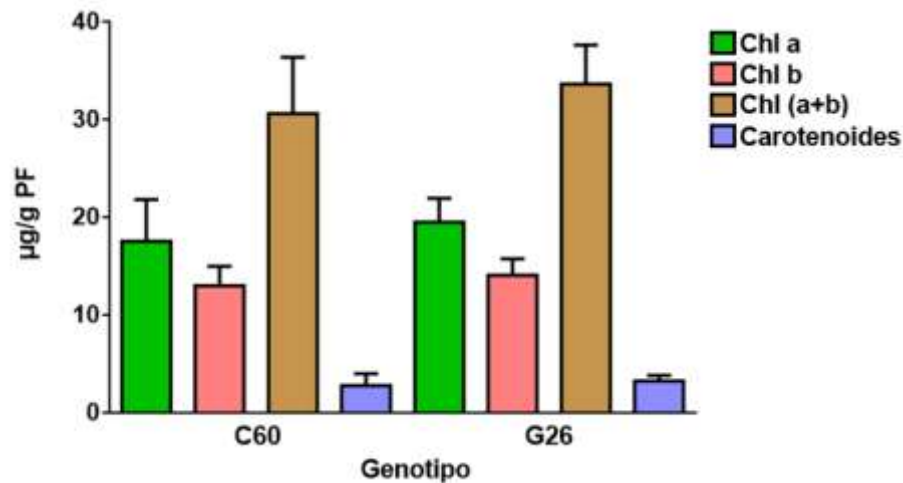


Figura 18. Cuantificación de clorofila en vainas de frutos de frijol. Se utilizaron frutos de 20 DDA de los genotipos C60 y G26. Las barras representan el promedio \pm DE, n=5 frutos. No se observan diferencias significativas ($P < 0.05$) según la prueba U de Mann-Whitney.

Por otro lado, el análisis de la actividad de Rubisco y la detección por western-blot de la cantidad de su subunidad grande presente en vainas de frutos de 20 DDA, tampoco muestra diferencias importantes entre ambos genotipos (Figura 19).

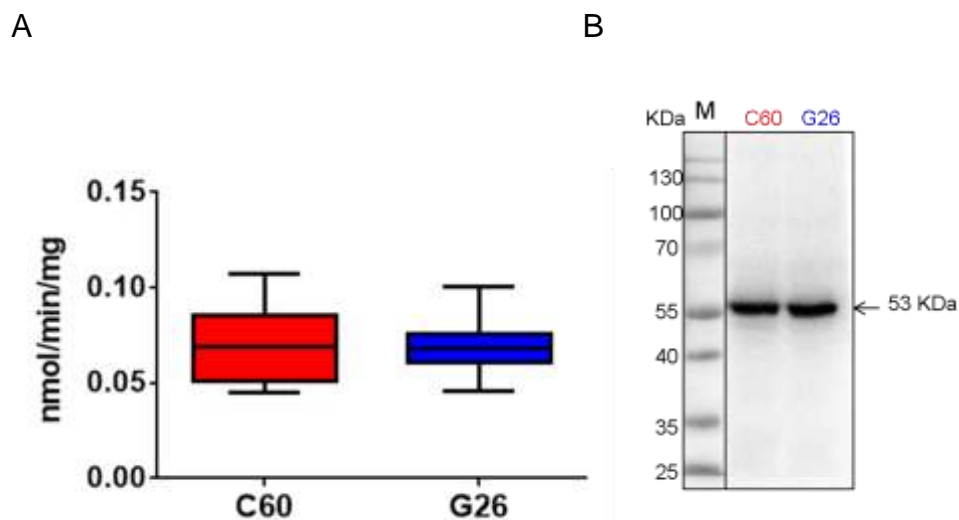


Figura 19. Análisis de la actividad (A) y la cantidad de Rubisco (B) presente en vainas de frutos de los genotipos C60 y G26 de 20 DDA. Las barras representan el promedio \pm DE, n=4 frutos. No se observan diferencias significativas ($P < 0.05$) según la prueba U de Mann-Whitney.

Finalmente, la observación al microscopio de los estomas en impresiones de la epidermis de las vainas en pegamento de contacto de secado rápido, muestra que C60 tiene más estomas, la mayoría de los cuales están cerrados, mientras que en G26 el número de estomas es menor, pero la mayoría se encuentran abiertos (Figura 20). Siendo esta última característica, la única que podría explicar la diferencia en la actividad fotosintética de las vainas entre genotipos.

Los resultados muestran que el mecanismo que regula su apertura es diferente. En hojas de *Vicia faba*, la humedad relativa del ambiente influye sobre la apertura de los estomas (Arve *et al.*, 2014). No obstante, en este caso las condiciones de cultivo fueron las mismas para las plantas de G26 y C60, por lo que es probable que las diferencias observadas no tengan relación con esta circunstancia. Sin embargo, podría ser interesante investigar si las diferencias entre genotipos se deben a su sensibilidad a las condiciones de humedad.

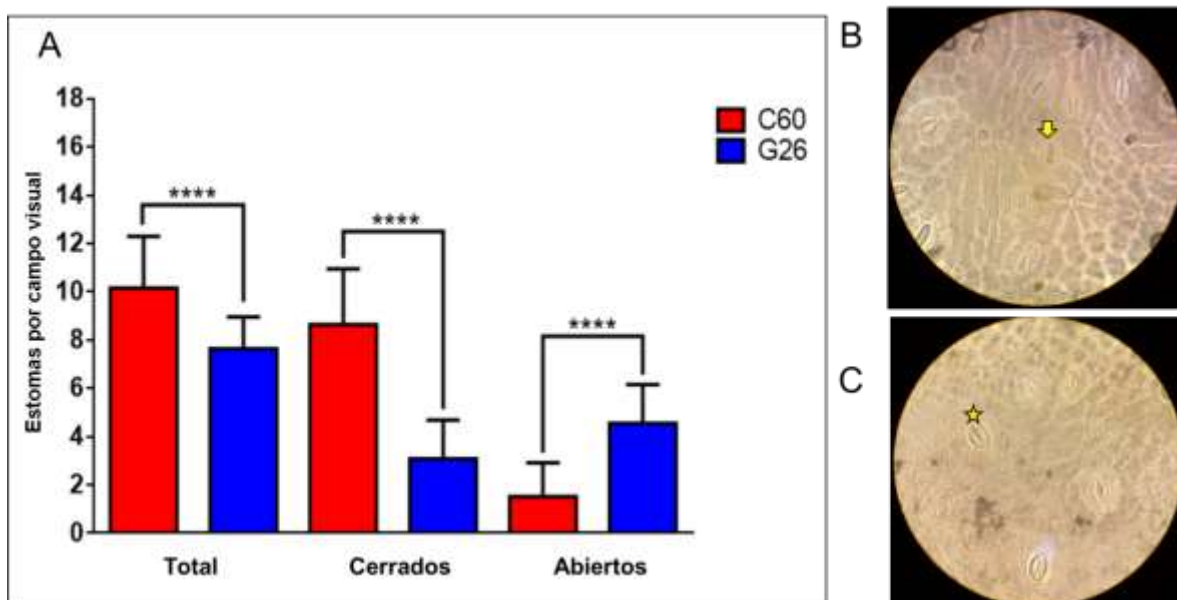


Figura 20. Análisis de las características de los estomas presentes en las vainas de frutos de frijol de 20 DDA. A partir de impresiones de la epidermis de los frutos se cuantificó el número de estomas presentes y la proporción de estomas cerrados y abiertos (A). B, Microscopía de los estomas de C60. C, Microscopía de los estomas de G26. Las barras representan el promedio \pm DE, n=3 frutos. **** diferencias significativas ($P < 0.001$) según la prueba U de Mann-Whitney. La flecha marca un estoma cerrado y la estrella un estoma abierto, ambas imágenes se obtuvieron fotografiando el campo visual de un objetivo 40x/0.60.

Estos resultados sugieren que la mayor capacidad de las vainas de G26 para fijar $^{14}\text{CO}_2$ (Figura 14), se debe a que en este genotipo es mayor la cantidad de estomas abiertos y sería muy interesante investigar las bases de los mecanismos responsables de las diferencias observadas entre los genotipos.

7.6 La fotosíntesis de la vaina y su relación con el contenido de carbohidratos y el desarrollo de las semillas

Los resultados anteriores muestran que la actividad fotosintética de la vaina de los frutos de frijol es importante, y que puede influir en el contenido de carbohidratos en esa estructura como en el desarrollo de las semillas. Para evaluar la importancia de la actividad fotosintética de los frutos sobre el desarrollo de las semillas, se realizó un experimento en donde frutos de 10 DDA se cubrieron con papel negro.

En ambos genotipos se observa que la concentración de clorofila tiende a disminuir a partir del día 2 en oscuridad, lo que indica que el tratamiento fue efectivo (Figura 21).

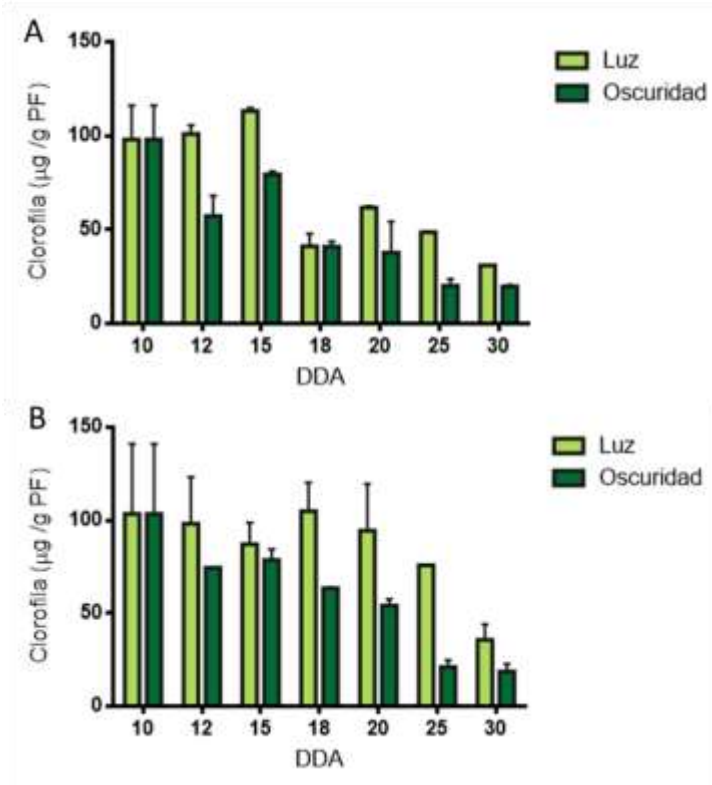


Figura 21. Efecto de la luz sobre el contenido de clorofila total en vainas durante el desarrollo frutos de frijol que fueron cubiertos a 10 DDA. A. Genotipo C60. B. Genotipo G26. Las barras representan el promedio \pm DE, n=3 frutos. DDA, días después de antesis.

También se estudiaron los efectos de la oscuridad y del desarrollo de fruto sobre los niveles de la subunidad grande de Rubisco (Figura 22). En ambos genotipos los niveles de Rubisco son máximos a los 15 DDA, y tienden a disminuir gradualmente a partir de ese momento.

En ambos genotipos la oscuridad redujo los niveles de Rubisco, sin embargo, se observan diferencias que dependen del genotipo. En C60 la señal observada a los 15 DDA aún es clara, disminuye en 20 y 25 DDA y aumenta un poco a los 30 DDA. En las vainas de G26 se puede observar que la disminución de la señal es más evidente, y que después del mínimo que se observa a los 15 DDA, hay un ligero incremento teniendo su nivel máximo en 30 DDA.

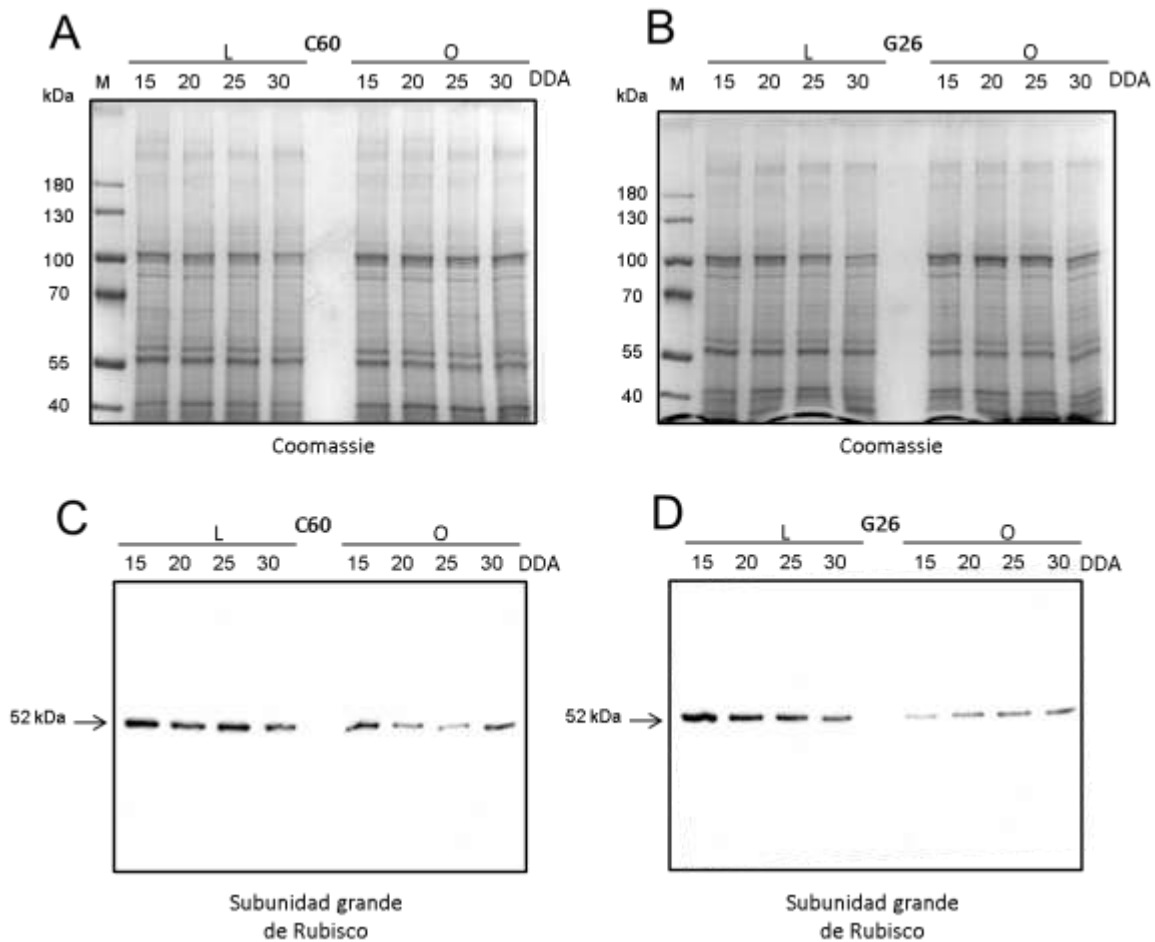


Figura 22. Efecto del desarrollo y de la luz sobre la cantidad de subunidad grande de Rubisco presente en vainas de frutos de frijol de los genotipos Canario 60 (C60) y G26. Los frutos que se desarrollaron en obscuridad (O) se taparon a 10 DDA y se compararon con frutos que crecieron en condiciones normales de iluminación (L). A y B corresponden a los geles de Coomassie utilizados como control de carga para el genotipo C60 y G26 respectivamente. C y D son las membranas donde se detectó la subunidad grande de Rubisco. DDA, días después de antesis.

Estos resultados indican que el tratamiento de cubrir las vainas fue efectivo y que la cantidad de Rubisco tiende a reducirse en ambos genotipos cuando las vainas se desarrollan en obscuridad. Aquí también puede observarse que en condiciones normales de desarrollo (con iluminación), los niveles de Rubisco empiezan a reducirse a partir del día 15 DDA. Sin embargo, la actividad fotosintética de las vainas tiene un comportamiento diferente y se mantiene alta aún después de que la cantidad de Rubisco ha empezado a disminuir (Fig. 16 y Fig. 22).

Una posible explicación a esta discrepancia es que aunque los niveles de Rubisco sean bajos o disminuyan conforme avanza el desarrollo de la vaina, la actividad de esta enzima se puede mantener alta gracias a los mecanismos que regulan su actividad. Dicha actividad es inhibida por azúcares que bloquean los sitios activos de la enzima, los cuales son disociados gracias a su chaperona molecular conocida como Rubisco activasa, así la Rubisco toma su conformación activa y continua con el proceso de fijación de CO₂ (Spreitzer *et al.*, 2002). De tal manera que la alta actividad fotosintética de los frutos luego de los 20 DDA se podría atribuir a que la Rubisco activasa tenga una mayor actividad en este periodo, por lo que sería interesante investigar esta propuesta.

Por otro lado, se determinó que el tratamiento de cubrir los frutos, pese a ser muy efectivo para reducir la cantidad de Rubisco, no afecta los niveles de almidón, glucosa, fructosa y sacarosa en las vainas, ya que se observó un efecto muy pequeño (Figura 23). Y tampoco se observaron cambios en el desarrollo de las semillas (Figura 23). Sin embargo, es interesante destacar que en las vainas de los frutos de ambos genotipos, la oscuridad induce un incremento muy ligero en la cantidad de azúcares solubles (20 DDA) y una reducción un poco más evidente en la cantidad de almidón, la cual es más marcada en 15 DDA para el genotipo C60 y en 12 DDA para el G26. Sin embargo, estos cambios no son estadísticamente significativos ($P < 0.05$) según la prueba U de Mann-Whitney.

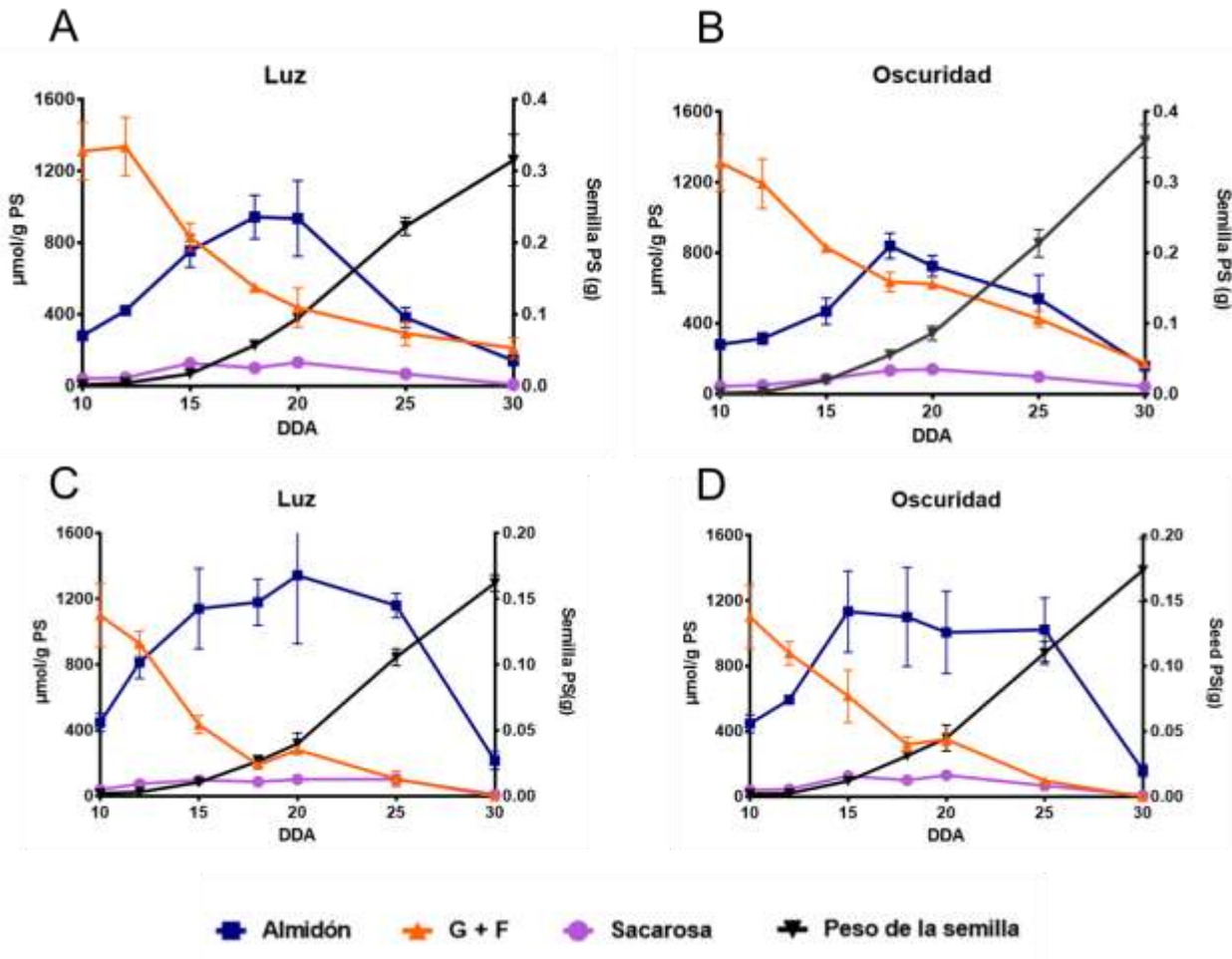


Figura 23. Efecto de la actividad fotosintética del fruto en el contenido de carbohidratos en vainas y sobre el desarrollo de las semillas. Las gráficas A y B corresponden al genotipo C60, mientras que los resultados del genotipo G26 se presentan en las gráficas C y D. Los frutos sometidos a oscuridad fueron tapados a 10 DDA. Los puntos representan el promedio \pm DE, n=3 frutos. DDA, días después de antesis.

7.7 Análisis del estado redox de la AGPasa

Los resultados de la Figura 23 también muestran que las vainas de ambos genotipos tienen la capacidad de sintetizar almidón en oscuridad. La actividad de la enzima AGPasa es clave en este proceso. Esta enzima es un heterotetrámero que consiste en dos subunidades grandes reguladoras y dos subunidades pequeñas que son catalíticas (Salamone *et al.*, 2000).

Como se describió en la sección 2.2.3, esta enzima es susceptible a una regulación postraduccional redox, donde la reducción del puente disulfuro que se forma entre los residuos de cisteína de la subunidades pequeñas, provoca que la enzima aumente su actividad, esta regulación depende de factores como la luz y la concentración de azúcares. (Tiessen *et al.*, 2002).

En la Figura 24 C y D, se observa el efecto del desarrollo del fruto y de la luz sobre la cantidad de la subunidad pequeña de AGPasa. En condiciones de iluminación puede apreciarse que la cantidad de proteína se incrementa durante el desarrollo del fruto y presenta un pico máximo en 20 DDA para ambos genotipos. Después, en ambos casos tiende a disminuir gradualmente.

Este patrón es opuesto en las vainas de los frutos que crecieron en oscuridad. En el C60 se aprecia una señal tenue a los 15 DDA, que aumenta considerablemente con el paso del tiempo y alcanza su punto más alto en 30 DDA. En el G26 el patrón es similar, aunque la señal observada a 15 DDA es más intensa.

El western-blot realizado con extractos proteicos elaborados en condiciones desnaturizantes pero no reductoras (sin β -Me), permite observar que una cantidad muy pequeña de la subunidad catalítica se encuentra en forma reducida (banda de 50 kDa), y que la gran mayor parte está en estado oxidado formando un dímero de 100 kDa (Figura 24 E y F).

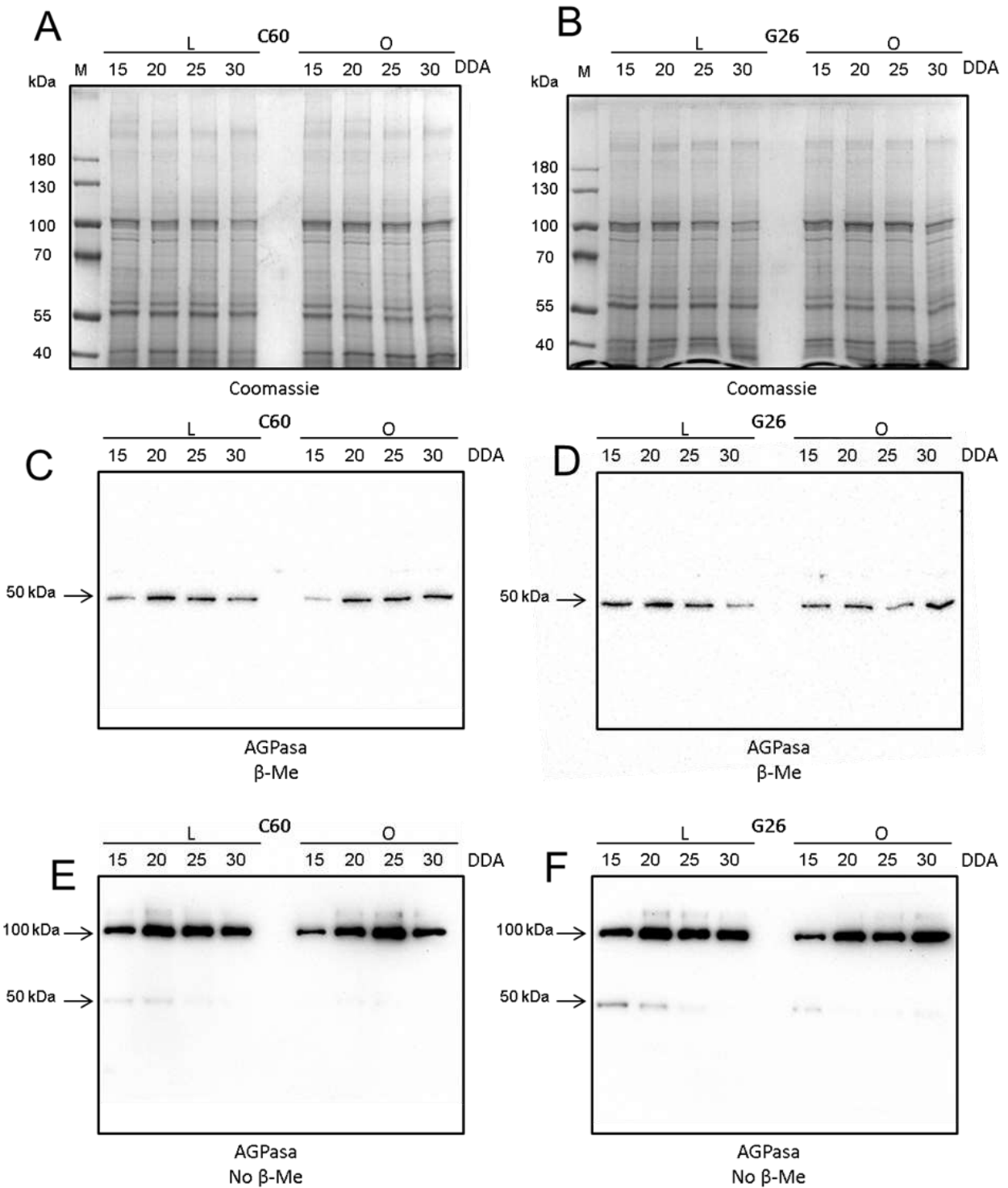


Figura 24. Inmunodetección de la subunidad catalítica de la AGPasa presente en vainas de frutos de frijol de los genotipos Canario 60 (C60) y G26, desarrollados en luz (L) y oscuridad (D). Los frutos se taparon a 10 DDA, las muestras de vainas que se tomaron en los días indicados y se usaron para elaborar extractos proteicos que se analizaron en condiciones desnaturalizantes y reductoras (A, B, C y D), así como en condiciones desnaturalizantes y no reductoras (E y F) para evaluar los cambios en la cantidad de esta subunidad y su estado redox.

Esto coincide con lo reportado por Li y col. (2012), donde se ha descrito que la regulación redox de la AGPasa, realmente tiene poco control sobre su actividad; y con los resultados de la Figura 13 donde se puede ver que la actividad de la AGPasa *in vitro* es la misma en ambos genotipos. Lo cual nos indica que probablemente sea la AGPasa en su estado oxidado la principal responsable de sintetizar la ADP glucosa en las vainas que se desarrollaron tanto en luz como en oscuridad.

La disminución en la cantidad de Rubisco en ambos genotipos y el aumento de la AGPasa durante el desarrollo del fruto, podrían indicar que los cloroplastos presentes en las vainas sufran un proceso de diferenciación dependiente del tiempo, convirtiéndose en amiloplastos, perdiendo su capacidad para fijar carbono pero conservando su capacidad para sintetizar almidón, lo cual coincide con que las vainas tengan niveles similares de almidón tanto en luz como en oscuridad (Flügge *et al.*, 2011).

Una posible explicación para este aumento en la cantidad total de AGPasa en oscuridad, es que la vaina se comporte más bien como un tejido heterotrófico y tenga un sistema de regulación de la transcripción de la AGPasa similar al de papa, pero que dependería de la luz y no de la concentración de azúcares, lo cual tiene sentido si consideramos que la concentración de glucosa y fructosa es alta en los primeros días de desarrollo de la vaina y luego disminuye (Figura 23). Otra posible explicación es que la reducción en la cantidad de carbono disponible para el desarrollo de las semillas, producto de la eliminación de la actividad fotosintética de la vaina, haya sido compensada incrementando el flujo de sacarosa hacia los frutos y que sean estos azúcares suministrados los que regulen la expresión de la AGPasa. Sin embargo en la Figura 25, se muestra que en ambos genotipos la oscuridad no modificó la cantidad de sacarosa que reciben los frutos.

En la figura 25 también se puede distinguir dos periodos de desarrollo, lo que se observa en ambos genotipos y está marcado por el crecimiento rápido de las semillas a partir de los 20 DDA. Esto coincide con el flujo de sacarosa si consideramos que durante el primer periodo de desarrollo, el carbono suministrado es utilizado para la síntesis de almidón, el cual se convertirá en la fuente principal de carbono para el crecimiento de las semillas luego de los 20 DDA.

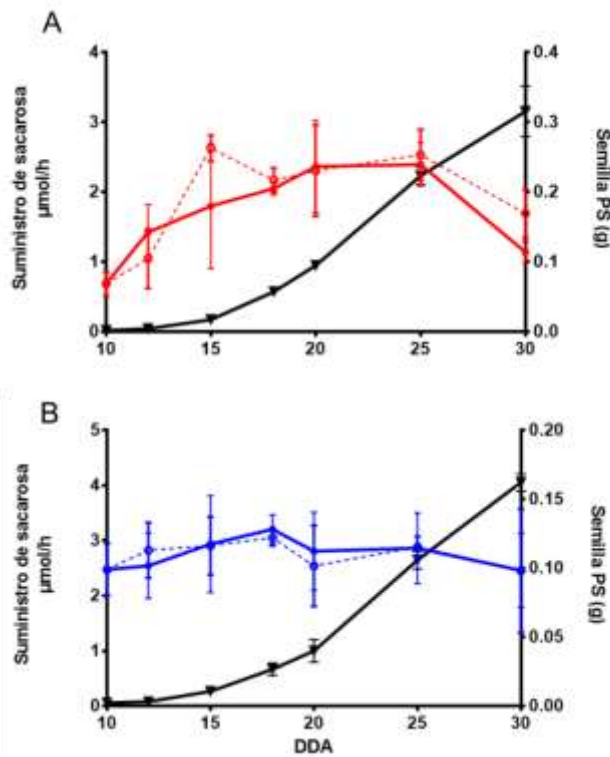


Figura 25. Flujo de sacarosa hacia los frutos. Las líneas continuas corresponden a los frutos desarrollados en luz y las líneas puntadas a los desarrollados en oscuridad tanto para el genotipo C60 (Rojo, A) como para el G26 (Azul, B). La línea continua de color negro corresponde al peso seco de la semilla. Los puntos representan el promedio \pm DE, n=3 frutos; DDA, días después de anthesis.

Todos estos resultados indican que en condiciones óptimas de riego, el suministro de sacarosa por parte de la planta es suficiente para garantizar el desarrollo de las semillas y la síntesis de almidón. Sugiriendo que en esas condiciones la actividad fotosintética de los frutos es una característica complementaria.

7.8 La vaina puede tener un límite de almacenamiento de carbono

Los datos que se han presentado son aparentemente contradictorios. Una parte de ellos (Figuras 14 a 22) indican que la actividad fotosintética de la vaina es relevante para la síntesis de almidón. Sin embargo, el cubrir los frutos no modificó las cantidades de carbohidratos presentes en las vainas, ni alteró el desarrollo de las semillas; lo que claramente indica que la actividad fotosintética de la vaina tiene un papel complementario.

Un análisis de los carbohidratos presentes en la vaina durante el desarrollo del fruto muestra que en condiciones normales los genotipos C60 y G26 los distribuyen de manera diferente (Figura 26). Cuando se suman todos los carbohidratos presentes en la vaina y se expresan como hexosas totales, se distingue un posible límite en su capacidad de almacenamiento (aproximadamente 1800 μmol de glucosa / g de peso seco). Lo que explicaría por qué es que los frutos, en condiciones óptimas de riego, tienen una aportación mínima hacia la síntesis de almidón por medio del carbono que fijan, haciendo que su actividad fotosintética se vuelva una característica complementaria que pudiera generar fotosintatos que excedan dicho límite de almacenamiento y que pudieran ser exportados a otros órganos de la planta como ha sido descrito en alfalfa (Zhang *et al.*, 2017).

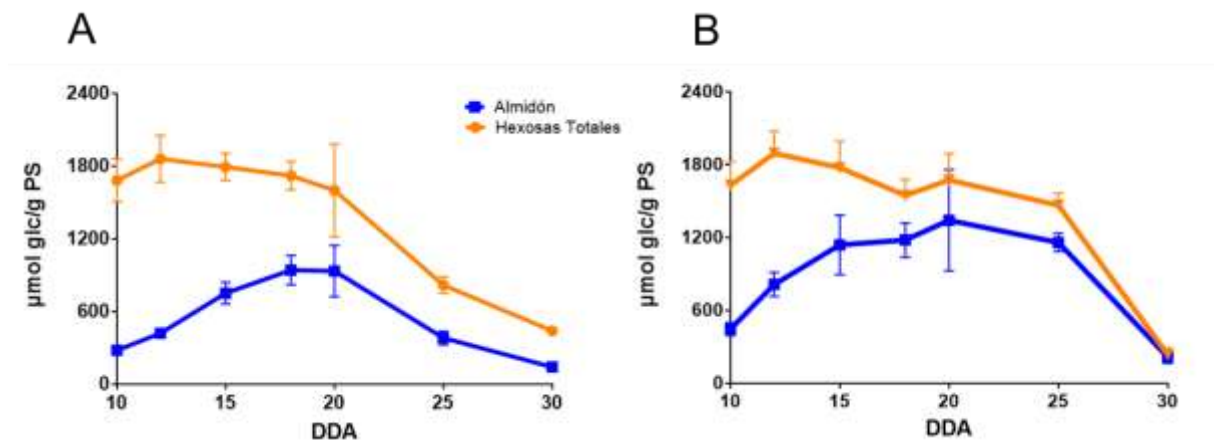


Figura 26. Distribución del carbono en las vainas de frutos de frijol a través del tiempo. Los valores de la línea naranja representan la suma $\pm\text{DE}$ de las concentraciones de glucosa, fructosa, sacarosa y almidón, expresados como hexosas. La línea azul corresponde al almidón. A. C60; B. G26, $n=3$ frutos.

Por otro lado, es probable que bajo condiciones de estrés que limiten el flujo de sacarosa a los frutos, la actividad fotosintética de la vaina se convierta en un elemento importante para el desarrollo de las semillas.

8 CONCLUSIONES

- Entre genotipos de frijol existen diferencias en la actividad fotosintética de las vainas de sus frutos.
- La actividad fotosintética de la vaina contribuye a la acumulación de almidón en esa estructura; Sin embargo, su papel es complementario y reducirla no afecta las concentraciones de carbohidratos en la vaina, ni reduce la velocidad de crecimiento de las semillas.
- La cantidad de AGPasa presente en la vaina está sujeta a una regulación compleja que depende tanto de la luz como de factores que se vuelven importantes en oscuridad y que aún necesitan ser estudiados a profundidad.
- La reducción de la subunidad catalítica de la AGPasa presente en las vainas de los frutos de frijol, no determina la actividad del complejo.

9 PERSPECTIVAS

- Probar si el almidón acumulado en la vaina ofrece alguna ventaja en el desarrollo de las semillas bajo condiciones de estrés por sequía.

10 REFERENCIAS

- Araki T, Kitano M, Eguchi H (1997) Evaluation of photoassimilate flux through a tomato pedicel. *Biotronics* 26: 21-29.
- Arve LE, Carvalho DRA, Olsen JE, Torre S (2014) ABA induces H₂O₂ production in guard cells, but does not close the stomata on *Vicia faba* leaves developed at high air humidity. *Plant Signal Behav* 9:e29192.
- Baldwin, KL, Strohm, AK, Masson, PH (2013) Gravity sensing and signal transduction in vascular plant primary roots. *Am. J. Bot.* 100 (1): 126-142.
- Baslam M, Baroja-Fernández E, Ricarte-Bermejo A, Sánchez-López AM, Aranjuelo I, Bahaji A, Muñoz FJ, Almagro G, Pujol P, Galarza R, Teixidor P, Pozueta-Romero J (2017) Genetic and isotope ratio mass spectrometric evidence for the occurrence of starch degradation and cycling in illuminated *Arabidopsis* leaves. *PLoS One* 12:2.
- Barratt DHP, Derbyshire P, Findlay K, Pike M, Wellner N, Lunn J, Feil R, Simpson C, Maule AJ, Smith AM (2009) Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 13124–13129.
- Bennett EJ, Roberts JA, Wagstaff C (2011) The role of the pod in seed development: strategies for manipulating yield. *New Phytologist* 190:838–853.
- Bernal L., Coello P, Martínez-Barajas E (2005) Possible role played by R1 protein in starch accumulation in bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings under phosphate deficiency. *J. Plant Physiol.* 162:970-976.
- Bitocchi E, Nanni L, Bellucci E, Rossi M, Giardini A, Zeuli PS (2012) Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:88–96.
- Bowsher CG, Scrase-Field EFAL, Esposito S, Emes MJ, Tetlow IJ (2007) Characterization of ADP-glucose transport across the cereal endosperm amyloplast envelope. *J Exp Bot* 58: 1321–1332.
- Broughton W, Hernandez G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J (2002) Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil* 252: 55–128.

Cakir B, Tian L, Crofts N, Chou HL, Koper K, Ng CY, Tuncel A, Gargouri M, Hwang SK, Fujita N, Okita TW (2019) Re-programming of gene expression in the CS8 rice line over-expressing ADPglucose pyrophosphorylase induces a suppressor of starch biosynthesis. *The Plant Journal* (2019) 1073-1088.

Coello P, Martínez-Barajas E (2016) Changes in Nutrient Distribution Are Part of the Mechanism That promotes seed Development Under severe Nutrient Restriction. *Plant Physiol Biochem.* 99: 21-26.

Crookston R K, O'toole, J & Ozbun J L (1974) Characterization of the bean pod as a photosynthetic organ. *Crop Sci.* 14, 708–712.

Cuellar-Ortiz SA, Arrieta-Montiel MP, Acosta-Gallegos J, Covarrubias AA (2008) Relationship between carbohydrate partitioning and drought resistance in common bean. *Plant Cell Environ.* 31: 1399-1409.

Diepenbrock W (2000) Yield analysis of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): a review. *Field Crops Research* 67:35–49.

Deschamps P, Haferkamp I, D'Hulst C, Neuhaus HE, Ball SG (2008) The relocation of starch metabolism to chloroplasts: when, why and how. *Trends Plant Sci* 13:574–582.

Doehlert DC, Kuo TM, Felker FC (1988) Enzymes of sucrose and hexose metabolism in developing kernels of two inbreds of maize. *Plant physiol* 86: 1013-1019.

Dong S, Beckles DM (2019) Dynamics changes in the starch-sugar interconversion within plant source and sink tissue promote a better abiotic stress response. *Journal of Plant Physiology* 234-235: 80-83.

FAO (2011) The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW) - Managing systems at risk. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome and Earthscan, London. pp. 100-134.

FAO (2018). Legumbres. Pequeñas semillas, grandes soluciones. Ciudad de Panamá. 5-22.

Fernandez O, Ishihara H, George GM, Mengin V, Flis A, Summer D, Arrivault S, Feil R, Lunn JE, Zeeman SC, Smith AM, Stitt M (2017) Leaf starch turnover occurs in long days and in falling light at the end of the day. *Plant Physiology* 174: 2199-2212.

Fettke J, Malinova I, Albrecht T, Hejazi M, Steup M (2011) Glucose 1-phosphate transport into protoplasts and chloroplasts from leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 155:1723-1734.

- Fichtner F, Olas JJ, Feil R, Watanabe M, Krause U, Hoefgen R, Stitt M, Lunn JE (2020) Functional features of TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE1, an essential enzyme in Arabidopsis. *The Plant Cell* 32:1949-1972.
- Fideicomisos instituidos en relación con la agricultura FIRA (2016) Panoragra alimentario del frijol. Dirección e investigación y evaluación económica sectorial. México. 1-31.
- Flügge U-I, Häusler RE, Ludewig F, Gierth M (2011) The role of transporters in supplying energy to plant plastids. *J Exp Bot* 62(7):2381-2392
- Geigenberger P (2011) Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. *Plant Physiol* 155:1566–1577.
- Gerhardt R, Stitt M, Heldt HW (1987) Measurement of subcellular metabolite levels in leaves by fractionation of freeze-stopped material in nonaqueous media. *Plant Physiol* 75: 542–547.
- Gibon Y, Blaßing OE, Palacios-Rojas N, Pankovic D, Hendriks JHM, Fisahn J, Höfne M, Günther M, Stitt M (2004) Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. *Plant J* 39: 847–862.
- Hädrich N, Hendriks JHM, Kötting O, Arrivault S, Feil R, Zeeman SC, Gibon Y, Schulze WX, Stitt M, Lunn JE (2012) Mutagenesis of cysteine 81 prevents dimerization of the APS1 subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase and alters diurnal starch turnover in Arabidopsis thaliana leaves. *The Plant Journal* 70: 231-242.
- Hendriks JHM, Kolbe A, Gibon Yves, Stitt M, Geigenberger P (2003) ADP-Glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugar in leaves of Arabidopsis and other plant species.
- James MG, Denyer K, Myers AM (2003) Starch synthesis in the cereal endosperm. *Curr Opin Plant Biol* 6: 215–222.
- Jones JB (1982). Hydroponics: its history and use in plant nutrition studies. *J. Plant Nutr.* 5: 1003-1030
- Kaplan, F, Guy, C.L. (2005) RNA interference of Arabidopsis beta-amylase8 prevents maltose accumulation upon cold shock and increases sensitivity of PSII photochemical efficiency to freezing stress. *Plant J.* 44 (5), 730–743.

- Kirchberger S, Leroch M, Huynen MA, Wahl M, Neuhaus HE, Tjaden J (2007) Molecular and biochemical analysis of the plastidic ADP-glucose transporter (ZmBT1) from *Zea mays*. *J Biol Chem* 282: 22481–22491.
- Kolbe A, Tiessen A, Schluepmann H, Paul M, Ulrich S, Geigenberger P (2005) Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11118–11123.
- Li J, Almagro G, Muñoz FJ, Baroja-Fernández E, Bahaji A, Montero M, Hidalgo M, Sánchez-López AM, Ezquer I, Sesma MT, Pozueta-Romero J (2012) Post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase in response to light is not a major determinant of fine regulation of transitory starch accumulation in arabidopsis leaves. *Plant Cell Physiol* 53(2): 433-444.
- Li J, Baroja-Fernández E, Bahaji A, Muñoz FJ, Ovecka M, Montero M, Sesma MT, Alonso-Casajús N, Almagro G, Sánchez-López AM, Hidalgo M, Zamarbide M, Pozueta-Romero J (2013) Enhancing sucrose synthase activity results in increased levels of starch and ADP-glucose in maize (*Zea mays* L.) seed endosperms. *Plant Cell Physiol*. 52: 282-294.
- Li N, Song D, Peng W, Zhan J, Shi J, Wang X, Liu G, Wang H (2019) Maternal control of seed weight in rapeseed (*Brassica napus* L.): the casual link between the size of pod mother, source) an seed (offspring, sink). *Plant Biotechnology Journal* 17: 736-749.
- Lv, Y, Yang, M, Hu, D, Yang, Z, Ma, S, Li, X, Xiong, L (2017) The OsMYB30 transcription factor suppresses cold tolerance by interacting with a JAZ protein and suppressing beta-amylase expression. *Plant Physiol* 173 (2) 1475-1491.
- Makeen K, Suresh Babu G, Lavanya G.R, Abraham G (2007) Studies of Chlorophyll content by Different Method in Black Gram (*Vigna mungo* L.). *International Journal of Agricultural Research* 2 (7): 651-647.
- Martinez-Barajas E, Luethy MH, Randall DD (1997) Molecular cloning and analysis of fuctokinase expression in tomato (*Lycopersion esculentum* Mill.). *Plant Science* 125: 13-20.
- McKinley BA, Casto AL, Rooney WL, Mullet JE (2018) Developmental dynamics of stem starch accumulation in *Sorghum bicolor*. *Plant Direct*. 2:1-15.
- Michalska J, Zauber H, Buchanan BB, Cejudo FJ, Geigenberger P (2009) NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 9908–9913.

Morandini Piero (2009) Rethinking metabolic control. *Plant science* 176: 441-451.

Muñoz FJ, Baroja-Fernández E, Morañ-Zorzano MT, Viale AM, Etxeberria E, Alonso-Casajús N, Pozueta-Romero J (2005) Sucrose synthase controls both intracellular ADP glucose levels and transitory starch biosynthesis in source leaves. *Plant Cell Physiol* 46: 1366–1376.

Muñoz FJ, Zorzano MTM, Alonso-Casajús N, Baroja-Fernandez E, Etxeberria E, Pozueta-Romero J (2006) New enzymes, new pathways and an alternative view on starch biosynthesis in both photosynthetic and heterotrophic tissues of plants. *Biocatalysis Biotransform* 24: 63–76.

Muñoz SR, (2010) Frijol, rica fuente de proteínas. *CONABIO. Biodiversitas* 89:7-11.

Nagata T, Hara H, Saitou K, Kobashi A, Kojima K, Yuasa T, Ueno O (2012) Activation of ADP-glucose pyrophosphorylase gene promoters by a WRKY transcription factor, AtWRKY20, in *Arabidopsis thaliana* L. and Sweet Potato (*Ipomoea batatas* Lam.) *Plant Prod. Sci.* 15: 10-18.

Nakamura Y, Ono M, Sawada T, Crofts N, Fujita N, Steup M (2017) Characterization of the functional interaction of plastidial starch phosphorylase and starch branching enzymes from rice endosperm during reserve starch biosynthesis. *Plant Science* 264:83-95.

Nielsen TH, Krapp A, Röper-Schwarz U, Stitt M (1998) The sugar-mediated regulation of genes encoding the small subunit of Rubisco and the regulatory subunit of ADP glucose pyrophosphorylase is modified by phosphate and nitrogen. *Plant Cell Environ* 21: 443–454.

Patzke K, Prananingrum P, Klemens PAW, Trentmann O, Rodrigues CM, Keller I, Fernie AR, Geigenberger P, Bölder B, Lehmann M, Schmitz-Esser S, Pommerrenig B, Haferkamp I, Neuhaus HE (2019) The plastidic sugar transporter pSuT influences flowering and affect cold responses. *Plant Physiology* 179: 569-587.

Peng, T, Zhu, X.F, Duan, N, Liu, J.H (2014) PtrBAM1, a beta-amylase-coding gene of *Poncirus trifoliata*, is a CBF regulon member with function in cold tolerance by modulating soluble sugar levels. *Plant Cell Environ.* 37 (12), 2754–2767.

Pérez S, Bertoft E (2010) The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: a comprehensive review. *Starch* 62:389–420.

Pfister B, Zeeman S (2016) Formation of starch in plant cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 73:2781–2807.

Radchuk R, Emery RJ, Weier D, Vigeolas H, Geigenberger P, Lunn JE, Feil R, Weschke W, Weber H (2010) Sucrose non-fermenting kinase 1 (SnRK1) coordinates metabolic and hormonal signals during pea cotyledon growth and differentiation. *Plant J* 61: 324–338.

Robinson CK, Hill SA (1999) Altered resource allocation during seed development in *Arabidopsis* caused by the *abi3* mutation. *Plant, Cell & Environment* 22:117–123.

Salamone P, Greene T, Kavakli I, Okita T (2000) Isolation and characterization of a higher plant ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit homotetramer, *FEBS Letters* 482:113–118.

Seferoglua AB, Barisb I, Morgilc H, Tulumc I, Ozdasa S, Cevahirc G, Kavaklia IH (2013). Transcriptional regulation of the ADP-glucose pyrophosphorylase isoforms in the leaf and the stem under long and short photoperiod in lentil. *Plant Science* 205-206: 29-37.

Scheible WR, Gonzalez-Fontes A, Lauerer M, Muller-Rober B, Caboche M, Stitt M (1997) Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell* 9:783–798.

Schiltz S, Munier-Jolain N, Jeudy C, Burstin J, Salon C (2005) Dynamics of exogenous nitrogen partitioning and nitrogen remobilization from vegetative organs in pea revealed by ¹⁵N in vivo labeling throughout seed filling. *Plant Physiology* 137:1463–1473.

Sessions RA, Zambryski PC. 1995. *Arabidopsis* gynoecium structure in the wild type and in *ettin* mutants. *Development* 1532: 1519–1532.

Seung D, Schreier TB, Bürgy L, Eicke S, Zeeman SC (2018) Two plastidial coiled-coil proteins are essential for normal starch granule initiation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 30: 1523-1542.

Spreitzer R. J., Salvucci M. E. (2002). Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annual Review of Plant Biology*. 53: 449–475.

Stark DM, Timmerman KP, Barry GF, Preiss J, Kishore GM (1992) Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP-glucose pyrophosphorylase. *Science* 258: 287–292.

Stitt M, Lunn J, Usadel B (2010) *Arabidopsis* and primary photosynthetic metabolism: more than the icing on the cake. *Plant J* 61: 1067–1091.

Stitt M, Zeeman SC (2012) Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Curr Opin Plant Biol* 15:1–11.

- Su X, Dees D, Dechesne A, Huang XF, Visser RGF, Tindade LM (2016) Starch phosphorylation plays an important role in starch biosynthesis. *Carbohydrate Polymers* 157: 1628-1637.
- Tetlow IJ, Morell MK, Emes MJ (2004) Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J Exp Bot* 55: 2131–2145.
- Thalman M, Pazmino D, Seung D, Horrer D, Nigro A, Meier T, Kölling K, Pfeifhofer HW, Zeeman SC, Santelia D (2016) Regulation of leaf starch degradation by abscisic acid is important for osmotic stress tolerance in plants. *The Plant Cell* 28: 1860-1878.
- Thalman M, Santelia D (2017) Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytologist* 214: 943-951.
- Thitisaksakul, M, Jiménez, R.C, Arias, M.C, Beckles, D.M (2012) Effects of environmental factors on cereal starch biosynthesis and composition. *J. Cereal Sci.* 56 (1), 67–80.
- Tiessen A, Hendriks J. H. M, Stitt M, Branscheid A, Gibon Y, Farré, Geigenberger P (2002) Starch Synthesis in Potato Tubers Is Regulated by Post-Translational Redox Modification of ADP-Glucose Pyrophosphorylase: A Novel Regulatory Mechanism Linking Starch Synthesis to the Sucrose Supply. *The Plant Cell* 14: 2191-2213.
- Tiessen A, Prescha K, Branscheid A, Palacios N, McKibbin R, Halford NG, Geigenberger P (2003) Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *Plant J* 35: 490–500.
- Tsai HL, Lue WL, Lu KJ, Hsieh MH, Wang SM, Chen J (2009) Starch synthesis in Arabidopsis is achieved by spatial cotranscription of core starch metabolism genes. *Plant Physiology* 151: 1582-1595.
- Turesson H, Andersson M, Marttila S, Thulin I, Hofvander P (2014) Starch biosynthetic genes and enzymes are expressed and active in the absence of starch accumulation in sugar beet tap-root. *BMC Plant Biology* 104: 1-12.
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019). World Population Prospects 2019: Ten Key Findings, electronic version:
https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_10KeyFindings.pdf. Recovery the November 20, 2019.
- Van Harselaar A, Lorenz J, Senning M, Sonnewald U, Sonnewald S (2017) Genome-wide analysis of starch metabolism genes in potato (*Solanum tuberosum* L.). *BMC Genomics* 18: 1-18.

Villadsen, D, Rung, J.H, Nielsen, T.H (2005) Osmotic stress changes carbohydrate partitioning and fructose-2,6-bisphosphate metabolism in barley leaves. *Funct. Plant Biol.* 32 (11), 1033–1043.

Wagstaff C, Yang TJ, Stead AD, Buchanan-Wollaston V, Roberts JA. (2009). A molecular and structural characterization of senescing *Arabidopsis* siliques and comparison of transcriptional profiles with senescing petals and leaves. *Plant Journal* 57: 690–705.

Wang H, Hou L, Wang M, Mao P (2016) Contribution of the pod wall to seed grain filling in alfalfa. *Scientific Reports* 6: 26586.

Wang H, Yan S, Xin H, Huang W, Zhang H, Teng S, Yu YC, Fernie AR, Lu X, Li P, Li S, Zhang C, Ruan YL, Chen LQ, Lang Z (2019) A subsidiary cell-localized glucose transporter promotes stomatal conductance and photosynthesis. *The Plant Cell* 31:1228-1343.

Zanella, M, Borghi, G.L, Pirone, C, Thalmann, M, Pazmino, D, Costa, A, Santelia, D, Trost, P, Sparla, F (2016) Beta-amylase 1 (BAM1) degrades transitory starch to sustain proline biosynthesis during drought stress. *J. Exp. Bot.* 67 (6), 1819–1826.

Zhang Y, Primavesi LF, Jhurrea D, Andralojc PJ, Mitchell RAC, Powers SJ, Schlupepmann H, Delatte T, Wingler A, Paul MJ (2009) Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol* 149: 1860–1871.

Zhang XM, Dou MA, Yao YL, Du LQ, Li JG, Sun GM (2011) Dynamic analysis of sugar metabolism in different harvest seasons of pineapple (*Ananas comosus* L. (Merr.)). *Afr J Biotechnol* 10: 2716–2723.

Zhang W, Mao P, Li Y, Wang M, Xia F, Wang H (2017). Assessing of the contributions of pod photosynthesis to carbon acquisition of seed in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Sci. Rep.* 7:42026.

Zhong Y, Blennow A, Kofoed-Enevoldsen O, Dong J, Hebelstrup K (2018) Protein targeting to starch 1 is essential for starchy endosperm development in barley. *Journal of Experimental Botany* 70: 485-496.