



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE LA ENZIMA DESPROPORCIONADORA DE ALMIDÓN
(DPE2) EN LA VAINA DEL FRUTO DE FRIJOL**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

KATHERINE IGCEL BERNAL ALVARADO

DIRECTOR DE TESIS

J. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Gálvez Mariscal María Amanda

VOCAL: Profesor: Montiel Aguirre Jesús Fernando

SECRETARIO: Profesor: Martínez Barajas J. Eleazar

1er. SUPLENTE: Profesor: Dimitrova Dinkova Tzvetanka

2° SUPLENTE: Profesor: Plata Ramos María del Consuelo

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 102. DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA. EDIFICIO E. FACULTAD DE QUÍMICA. UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dr. J. Eleazar Martínez Barajas

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Lilia Angélica Bernal Gracida

SUSTENTANTE:

Katherine Igcel Bernal Alvarado

AGRADECIMIENTOS. LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO FUE POSIBLE GRACIAS AL APOYO GENEROSO RECIBIDO DE DGAPA-UNAM (PROYECTO IN226520: ESTUDIO DE LA IMPORTANCIA DEL ALMIDÓN ACUMULADO EN LA VAINA DE LOS FRUTOS, PARA MANTENER EN DESARROLLO DE LAS SEMILLAS, EN PLANTAS DE FRIJOL AFECTADAS POR SEQUÍA TRANSITORIA), Y DE LA FACULTAD DE QUÍMICA-UNAM (PAIP 5000-9127).

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	1
3. GENERALIDADES DEL FRIJOL	3
3.1 IMPORTANCIA DEL FRIJOL EN MÉXICO.....	3
4. LA VAINA DEL FRIJOL	5
5. CARACTERÍSTICAS DEL ALMIDÓN	6
5.1 COMPOSICIÓN DEL ALMIDÓN	6
5.2 IMPORTANCIA DEL ALMIDÓN PARA LAS PLANTAS.....	8
6. METABOLISMO DEL ALMIDÓN	9
6.1 METABOLISMO DEL ALMIDÓN TRANSITORIO	9
6.1.1 Ciclo de Calvin.....	9
6.1.2 Síntesis del almidón transitorio	10
6.1.2.1 <i>ADP glucosa pirofosforilasa (AGPasa)</i>	11
6.1.2.1.1 <i>Tipos de regulación de la AGPasa</i>	12
6.1.2.2. <i>Almidón sintetasas (SS)</i>	14
6.1.2.2.1 <i>El papel de las almidón sintetasas</i>	14
6.1.2.3. <i>Enzimas ramificadoras (SBE)</i>	15
6.1.2.4. <i>Enzimas desramificadoras (DBE)</i>	16
6.1.3 Degradación del almidón transitorio.....	17
6.1.3.1 <i>Metabolismo de glucanos en la superficie del gránulo de almidón</i>	18
6.1.3.2 <i>Metabolismo de maltooligosacáridos</i>	19
6.1.3.3 <i>Metabolismo de maltosa</i>	20
6.2 METABOLISMO DEL ALMIDÓN DE RESERVA	21
6.2.1 Síntesis del almidón de reserva	21
6.2.2 Degradación del almidón de reserva	24
7. EL PAPEL DE LAS ENZIMAS DESPROPORCIONADORAS EN EL METABOLISMO DEL ALMIDÓN	25
8. PRESENCIA DE DPEs EN LA VAINA DEL FRIJOL.....	27
8.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	27

8.2 DETECCIÓN DE LA ENZIMA DPE2 EN VAINAS DE FRUTOS DE FRIJOL	29
8.2.1 Metodología	29
8.2.1.1 <i>Material biológico</i>	30
8.2.1.2 <i>Preparación del extracto proteico</i>	30
8.2.1.3 <i>Precipitación con sulfato de amonio</i>	30
8.2.1.4 <i>Cuantificación de proteína</i>	30
8.2.1.5 <i>Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)</i>	31
8.2.1.6 <i>Inmunodetección de la enzima desproporcionadora</i>	31
8.2.2 Resultados	32
8.2.3 Discusión.....	34
8.2.4 Conclusiones.....	35
9. REFERENCIAS	36
10. BIBLIOGRAFÍA	41
11. ANEXO	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Fruto del frijol y las partes que lo conforman.....	5
Fig. 2. Modelo de asignación de recursos.	6
Fig. 3. Representación esquemática de la estructura del gránulo de almidón.	7
Fig. 4. Organización de la amilosa y de la amilopectina en el gránulo de almidón.	8
Fig. 5. El ciclo de Calvin a detalle.....	10
Fig. 6. Ruta de la biosíntesis del almidón en el estroma del cloroplasto	11
Fig. 7. Mecanismos de regulación de la AGPasa plastidial.	12
Fig. 8. Reacción de ramificación de un α -glucano catalizada por la enzima ramificadora (SBE).....	16
Fig. 9. Enzimas que participan en la síntesis de almidón.	16
Fig. 10. La ruta de la síntesis de almidón a partir de G1P.	17
Fig. 11. Ruta propuesta de la degradación del almidón en las hojas de <i>Arabidopsis</i> durante la noche	20
Fig. 12. Acción de la enzima DPE1 en maltotriosa.	25
Fig. 13. Acción de la enzima DPE2.	26
Fig. 14. Comparación de la estructura del gen de las enzimas DPE1 y DPE2 de <i>Phaseolus vulgaris</i> con los genes equivalentes en <i>A. thaliana</i>	28
Fig. 15. Metodología usada para el estudio de los cambios en la cantidad de las enzimas DPE2 en vainas de frutos de frijol durante el desarrollo de las semillas.	29
Fig. 16. Electroforesis SDS-PAGE de las muestras de vaina de frijol de diferentes edades.....	32
Fig. 17. Inmunodetección de la enzima DPE2 en los extractos de vainas de frutos de frijol	33
Fig. 18. Electroforesis SDS-PAGE de los extractos de vaina de frijol precipitados con sulfato de amonio.	33
Fig. 19. Inmunodetección de la enzima DPE2 en extractos de vaina precipitados distintas concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Funcionalidades del almidón en la industria alimentaria	2
Tabla 2. Principales limitaciones de producción del frijol común	4
Tabla 3. Contenido de amilosa y amilopectina presente en gránulos de almidón de diferentes especies	7
Tabla 4. Enzimas que participan en la síntesis y degradación de almidón en <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
Tabla 5. Genes que codifican las enzimas DPE de <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i>	27

ABREVIATURAS

aa. aminoácidos

ADP. Adenosina difosfato

AGPasa. ADP-glucosa pirofosforilasa

ATP. Adenosina trifosfato

DBE. Enzimas desramificadoras

DDF. Días después de la floración

DPE1. Enzima Desproporcionadora 1 (Plastídica)

DPE2. Enzima Desproporcionadora 2 (Citosólica)

GBSS. Almidón sintasa unida al gránulo de almidón

kDa. kilo Dalton

NADPH. Nicotiamida-Adenina dinucleotido fosfato

(NH₄)₂SO₄. sulfato de amonio

SBE. Enzimas ramificadoras

SS. Almidón sintasas

1. RESUMEN

El presente Trabajo de Actualización Monográfica describe los aspectos más sobresalientes de los procesos de síntesis y degradación del almidón en hojas y semillas de una leguminosa. También incluye una pequeña sección experimental que evidencía la presencia de la enzima DPE2 en la vaina de los frutos de frijol (*Phaseolus vulgaris*), y se discute su posible participación en la degradación del almidón que se acumula en esa estructura.

2. INTRODUCCIÓN

El almidón es uno de los carbohidratos más abundantes en la naturaleza, que juega un papel muy importante en la nutrición tanto del hombre como de animales domésticos (Butler et. al., 2004). Es un polímero natural, barato, abundante y biodegradable que muchas plantas producen para almacenar energía. Se encuentra en hojas, tallos, raíces y semillas de cultivos básicos como arroz, maíz, trigo y papa (Ochubiojo y Rodrigues, 2012).

El que es extraído de la planta se denomina “almidón nativo”; sin embargo, la inestabilidad de la viscosidad y la retrogradación que experimenta después de la gelatinización limitan sus aplicaciones industriales. Existen distintos procedimientos químicos o físicos para modificar sus propiedades (Ochubiojo y Rodrigues, 2012). Gracias a ellos, el “almidón modificado” se usa en una amplia gama de alimentos con múltiples propósitos, entre los que se incluyen espesar, gelificar, estabilizar componentes y reemplazar ingredientes más costosos (Tabla 1, Mason, 2009).

Tabla 1. Funcionalidades del almidón en la industria alimentaria (Modificado de Mason, 2009).

Función	Alimentos
Adhesión	Alimentos fritos
Aglutinación	Carne molida y sazonadores
Agente enturbiante	Bebidas
Agente texturizante	Alimentos fritos y horneados
Estabilizante de emulsions	Bebidas, sustitutos de crema
Encapsulamiento	Sabores
Expansión	Snacks, cereals
Sustituto de grasa	Helados, aderezos, alimentos untables
Estabilizante de espumas	Malvaviscos
Gelificación	Confitería
Glaseado	Panificación
Retención de humedad	Pastelería, cárnicos
Agente espesante	Sopas, rellenos para repostería

El metabolismo del almidón es complejo y, a pesar de que se ha estudiado intensamente, aún se desconocen aspectos que son críticos para entender su papel en el desarrollo de las plantas. En algunos casos la evidencia genética está incompleta y no es posible definir con certeza si la participación de una enzima es exclusiva de los procesos de síntesis o degradación. Las enzimas almidón fosforilasa, pululanasa y desproporcionadora (o enzima D) pertenecen a esta categoría (Bresolin et al., 2006).

Las enzimas desproporcionadoras rompen los enlaces glucosídicos α -1,4 y transfieren parte de la molécula a otro glucano que actúa como aceptor, cuyo grado de polimerización (DP) aumenta (Smirnova et al., 2015). DPE2 transfiere un residuo de glucosilo de β -maltosa a uno de los extremos no reductores de un carbohidrato de alto peso molecular, al mismo tiempo que el otro glucosilo se libera como glucosa (Chia et al., 2004). La información disponible indica que esta enzima (ubicada en el citosol), constituye la ruta más importante para la conversión de la maltosa (principal producto de la degradación del almidón), en sacarosa, molécula que se usa para distribuir los productos de la degradación del almidón en el resto de la planta (Lunn y MacRae, 2003).

El presente Trabajo de Actualización Monográfica tiene como objetivo hacer una revisión detallada de las características del almidón y de los procesos de su síntesis y degradación en hojas y semillas, haciendo especial énfasis en el papel

de la enzima desproporcionadora citosólica (DPE2) dentro de los mismos. También se incluyen resultados del análisis realizado en el pericarpio de los frutos de frijol (vaina) para evaluar la presencia de la enzima DPE2 durante el desarrollo de las semillas. El pericarpio de los frutos acumula cantidades importantes de almidón y las investigaciones realizadas forman parte de los esfuerzos por dilucidar su importancia en el desarrollo de las semillas, especialmente bajo condiciones de estrés.

3. GENERALIDADES DEL FRIJOL

3.1 IMPORTANCIA DEL FRIJOL EN MÉXICO

El frijol se clasifica dentro del género *Phaseolus* y la familia *Fabaceae*. Es una planta herbácea, de ciclo anual. Los estudios arqueológicos revelan que el género *Phaseolus* tiene su origen en el continente americano. México forma parte de uno de los centros de origen de esta especie, y se estima que en el país existen cerca de 47 variedades nativas (Silva-Cristobal et al., 2010).

Su cultivo es clave en la dieta nacional, el consumo anual per cápita es de 10.4 kg (FIRA, 2019), y la producción nacional cubre casi la totalidad de los requerimientos de consumo de los mexicanos. Durante 2016 se generaron 1.08 millones de toneladas que cubrieron 89.24% del consumo nacional. México es el cuarto productor de frijol, pues genera 5.5% de la producción mundial (SAGARPA, 2017).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa alimenticia más importante en América Latina tropical y África del Este y Sur. Por lo general, no se adapta bien a entornos climáticos y edáficos extremos. Se estima que el cambio climático aumentará la intensidad de las limitaciones bióticas a la producción de frijol, y que sequías más intensas afectarán adversamente importantes regiones de producción en México, Centroamérica, el Caribe y África del Sur. La Tabla 2 enumera las principales limitaciones de producción para la producción de frijol común (Beebe et al., 2013).

Tabla 2. Principales limitaciones de producción del frijol común (Modificado de Beebe et al., 2013).

LIMITANTE	IMPORTANCIA
Limitantes abióticas	
Sequía	+++
Calor	+++
Deficiencia de Nitrógeno	++
Deficiencia de Fósforo	+++
Toxicidades del suelo ácido (Al, Mn)	++
Enfermedades virales	
VMCF / VMNCF	+
VMDF / VMDAF	+++
Enfermedades fúngicas	
Mancha angular de la hoja	++
Antracnosis	++
<i>Pythium</i>	+
<i>Fusarium</i>	+
Roya	++
Enfermedades bacterianas	
Tizón común bacteriano	+
Plagas de insectos	
Gorgojo	++
Mosquita blanca (<i>Trialeurodes vaporariorum</i> y <i>Bemisia Tabaci</i>)	+
<i>Apion sp.</i>	+

VMCF = virus del mosaico común del frijol; VMNCF = virus del mosaico necrótico común del frijol; VMDF = virus del mosaico dorado del frijol; VMDAF = virus del mosaico dorado amarillo del frijol. Severidad de la limitación: + = baja; ++ = moderada; +++= alta.

Dado que no se dispone de herramientas biotecnológicas para manipular el genoma de las plantas de frijol (sistemas de transformación eficientes), su mejoramiento se basa en el uso de técnicas tradicionales, para lo cual es necesario identificar las bases moleculares de los procesos que contribuyen a la adaptación del cultivo a condiciones de estrés (Rendón-Anaya y Herrera-Estrella, 2017). Los esfuerzos sistemáticos en esta dirección permitirán evaluar la diversidad genética y la identificación de adaptaciones útiles para la resistencia a las enfermedades, la tolerancia al estrés abiótico y otros desafíos agronómicos a fin de aumentar la resiliencia y la productividad de la agricultura (Rendón-Anaya y Herrera-Estrella, 2017).

4. LA VAINA DEL FRIJOL

La vaina (también conocida como pericarpio, Figura 1), es el órgano que cubre a las semillas durante su desarrollo, y las protege del ataque de plagas y patógenos (Bennett et al., 2011).

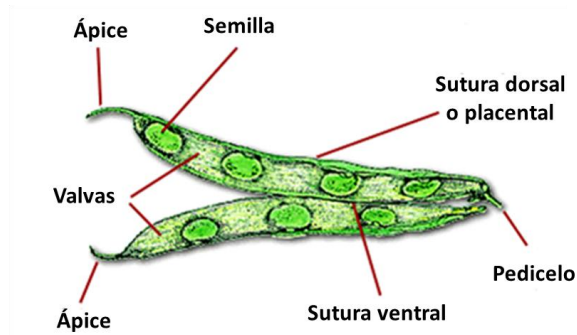


Fig. 1. Fruto del frijol y las partes que lo conforman. (Arias et al., 2007).

Es una estructura fotosintéticamente activa, por donde pasan los solutos con los que las partes vegetativas de la planta nutren a las semillas en desarrollo (Muntz et al., 1976). Estas características se complementan con la capacidad para almacenar recursos que posteriormente se exportan a las semillas en desarrollo (Bennett et al., 2011).

En las etapas iniciales del desarrollo de los frutos de leguminosas, las vainas representan el principal órgano de “demanda” de los compuestos orgánicos que son translocados desde los órganos vegetativos al fruto. Cuando las vainas alcanzan su tamaño máximo, las semillas se convierten en el órgano “demanda” más importante. En este período, los solutos procedentes de las partes vegetativas de la planta que llegan a las vainas, se translocan rápidamente a las semillas (Muntz et al., 1976).

Sin embargo, se ha observado que a partir de la antesis, la vaina puede almacenar cantidades importantes de nitrógeno y carbono que posteriormente se remobilizan a las semillas (Bennett et al., 2011). Adicionalmente, se ha detectado la existencia de un circuito de retroalimentación dinámico en el que las vainas, envían a las hojas señales que indican sus necesidades de recursos, lo que provoca la movilización de los fotoasimilados en una relación directa con la

intensidad de la señal recibida (Bennett et al., 2011), como se representa en la Figura 2.

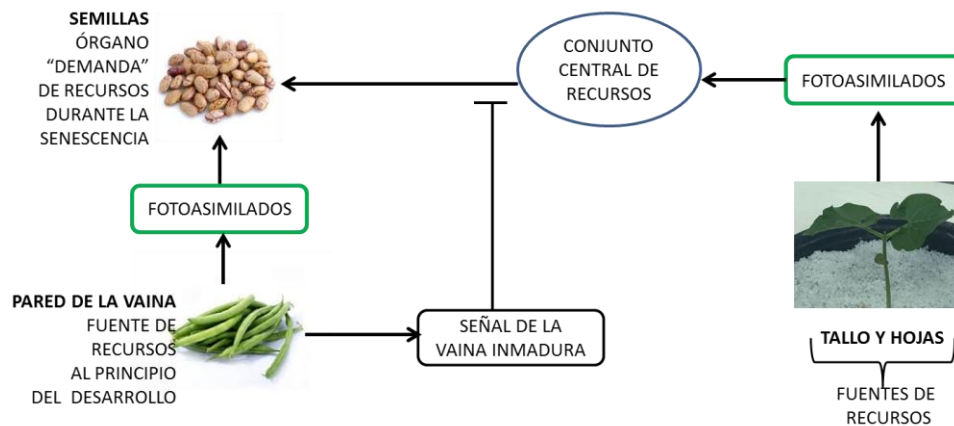


Fig. 2. Modelo de asignación de recursos. Los órganos verdes, como las hojas y los tallos, producen asimilados que son movilizados hacia el conjunto central de recursos de la planta. La actividad fotosintética de la vaina genera recursos que son importantes al principio del desarrollo; conforme avanza la maduración de la semilla, la vaina se convierte en un órgano "demanda" (Modificada de Bennett et al., 2011).

El modelo de Bennett (2011), está basado en estudios realizados en *Aradidopsis thaliana*, por lo que es necesario investigar si en especies cultivadas como *Phaseolus vulgaris* la asignación de recursos se regula de manera similar.

5. CARACTERÍSTICAS DEL ALMIDÓN

5.1 COMPOSICIÓN DEL ALMIDÓN

Los gránulos de almidón, están compuestos de dos tipos de polisacáridos: amilosa y amilopectina, cuyas proporciones pueden variar dependiendo de la especie, tejido o etapa de desarrollo (Kossmann y Lloyd, 2000).

La molécula de amilosa está formada de residuos de α -D-glucopiranosilo unidos por enlaces α -1,4 (840 a 22000 unidades de α -D-glucopiranosilo y un peso molecular alrededor de 136 000 a 3.5×10^6 Da). El número de unidades de glucosa varía bastante según la especie y la etapa de desarrollo. Por otro lado, la estructura es esencialmente una cadena lineal, o poco ramificada (producto de la presencia de un enlace α -1,6-D glucopiranososa cada 170 a 500 unidades de glucosilo).

Por el contrario, la amilopectina es una molécula ampliamente ramificada, y se estima que alrededor del 4 al 5% de sus enlaces glucosídicos son α -1,6 (Preiss, 2004).

En la tabla 3 se muestra el contenido de amilosa y amilopectina de algunos de los almidones más comúnmente usados.

Tabla 3. Contenido de amilosa y amilopectina presente en gránulos de almidón de diferentes especies (Modificado de Bertoft, 2015).

ESPECIE	AMILOSA (%)	AMILOPECTINA (%)	REFERENCIA
Cebada	28.3	71.7	Bertoft et al., 2008.
Trigo	33.2	66.8	Kalinga et al., 2013.
Maíz (<i>waxy</i>)	1.0	99.0	Vermeylen et al., 2004.
Arroz	12.8-24.2	87.2-75.8	Koroteeva et al., 2007
Camote	19.8	80.2	Srichuwong et al., 2005.
Tapioca	17.6	82.4	Bertoft et al., 2008.
Papa	17.9	82.1	Bertoft et al., 2008.

La arquitectura interna de los gránulos de almidón se caracteriza por la presencia de "anillos de crecimiento" (Figura 3), que se aprecian como "conchas" concéntricas semicristalinas de 120 a 400 nm de espesor, separadas por regiones amorfas. Las regiones cristalinas consisten en una alternancia regular de laminillas amorfas y cristalinas (Figura 3b) separadas por una distancia de 9-10 nm. (Fig. 3c y d) (Lourdin, 2015).

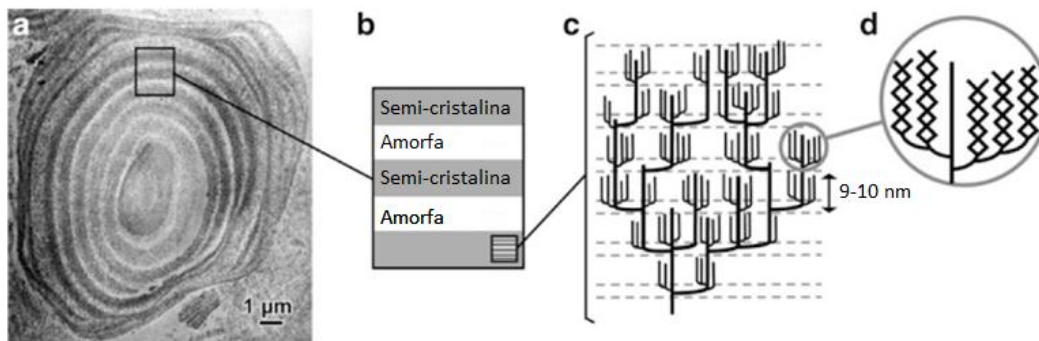


Fig. 3. Representación esquemática de la estructura del gránulo de almidón. (a) sección ultrafina de un gránulo de almidón de maíz; (b) alternancia de anillos de crecimiento amorfos y semicristalinos; (c) modelo de "empaquetamiento" de amilopectina; (d) detalle de un grupo que muestra la formación de dobles hélices a partir de las ramas cortas de amilopectina (Modificado de Lourdin et al., 2015).

La amilopectina es el componente responsable de la organización laminar del gránulo de almidón. La laminilla cristalina está formada por dobles hélices de cadenas externas cortas de amilopectina con un promedio de 11 a 15 residuos de glucosa. Estas dobles hélices forman cristales de amilopectina (conocidos también como cadenas) de tipo A, cadenas tipo B, o cadenas de tipo C (Bertoft, 2015).

La cadena de tipo A está compuesta por cadenas de glucano cortas que están empaquetadas de manera uniforme y densa y, en consecuencia, excluyen más agua. La cadena B se compone de cadenas de α -glucanos más largas y dispersas que forman una red hexagonal, lo que permite una mayor incorporación de agua (Figura 4). Los gránulos de almidón también pueden contener una mezcla de cadenas de tipo A y B, lo que se denomina como cadena tipo C (MacNeill et al., 2017).

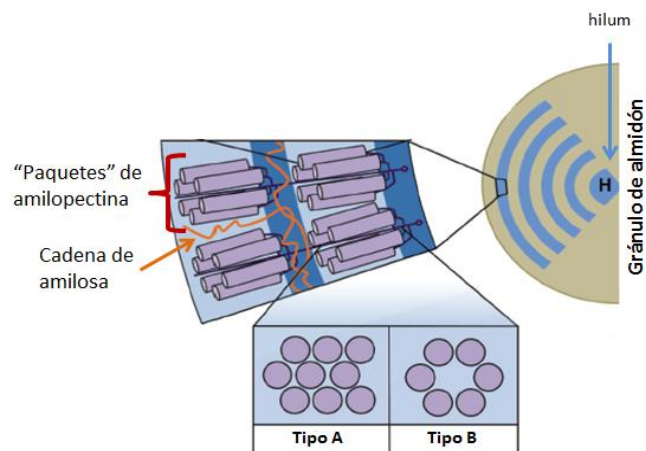


Fig. 4. Organización de la amilosa y de la amilopectina en el gránulo de almidón. Cada anillo de crecimiento consta de grupos formados por regiones amorfas alternas que contienen puntos de ramificación de amilopectina (azul oscuro) y laminillas cristalinas (regiones que contienen grupos ordenados de cadenas lineales de glucano; azul claro), con una periodicidad de ~ 9 nm. La amilosa (naranja) se intercala en la capa amorfa y entre los racimos. Dentro de las laminillas cristalinas, las cadenas de glucanos lineales vecinas interactúan para formar hélices dobles (violetas) que dan lugar a las cadenas de tipo A o de tipo B (Modificado de MacNeill et al., 2017).

5.2 IMPORTANCIA DEL ALMIDÓN PARA LAS PLANTAS

El almidón es un polímero de almacenamiento de carbono semicristalino que cumple funciones muy importantes en la fisiología de las plantas. De manera general se le clasifica en almidón de almacenamiento y transitorio. El primero se sintetiza y acumula en los amiloplastos como reserva de energía a largo plazo. Por su parte, el almidón transitorio se acumula en los cloroplastos; se sintetiza durante

el día y degrada por la noche, lo que garantiza el suministro constante de carbono reducido (MacNeill et al., 2017). El almidón tiene un papel central en el balance de carbono de las plantas, y su función biológica cambia durante el desarrollo y en respuesta al medio ambiente. Cuando se degrada actúa como “fuente” que libera carbono para uso en el crecimiento y desarrollo; por otro lado, su síntesis lo convierte en un “almacén” de carbono, ya sea de manera permanente (en semillas y tubérculos), o como una reserva temporal en órganos como hojas, tallos y flores (MacNeill et al., 2017).

6. METABOLISMO DEL ALMIDÓN

6.1 METABOLISMO DEL ALMIDÓN TRANSITORIO

6.1.1 Ciclo de Calvin

El ciclo de Calvin es la vía principal para la fijación de carbono. Tiene lugar en los cloroplastos y consta de 13 reacciones catalizadas por 11 enzimas. El proceso se puede dividir en tres etapas (Figura 5), en la primera de ellas (denominada carboxilación), la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) es aceptora de una molécula de CO_2 . Esta reacción es catalizada por la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa / oxigenasa (Rubisco). Se produce un intermediario inestable que da origen a 2 moléculas de 3-fosfoglicerato (PGA). La segunda etapa se denomina de reducción; en ella se utilizan ATP y NADPH para formar triosas fosfato. Finalmente, en la etapa de regeneración, parte de las triosas fosfato se usan para producir RuBP y permitir que el ciclo continúe (Tamoi et al., 2005).

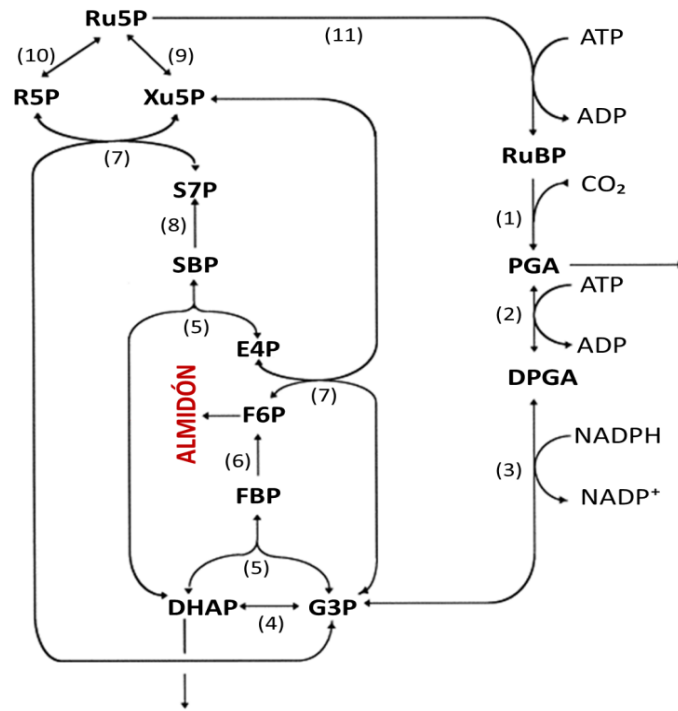


Fig. 5. El ciclo de Calvin a detalle. DHAP, dihidroxiacetona fosfato; DPGA, 1,3-bisfosfoglicerato; E4P, eritrosa 4-fosfato; F6P, fructosa 6-fosfato; FBP, fructosa 1,6-bisfosfato; G3P, gliceraldehido 3-fosfato; PGA, 3-fosfoglicerato; RuBP, ribulosa 1,5-bisfosfato; Ru5P, ribulosa 5-fosfato; R5P, ribosa 5-fosfato; SBP, sedoheptulosa 1,7-bisfosfato; S7P, sedoheptulosa 7-fosfato; Xu5P, xilulosa 5-fosfato. Las siguientes enzimas se indican mediante números: (1)* Rubisco; (2) 3-fosfoglicerato cinasa; (3) NADP-GAPDH; (4) triosa -fosfato isomerasa; (5) aldolasa; (6)* FBPasa; (7) transcetolasa; (8)* sedoheptulosa 1,7-bisfosfato; (9) ribulosa 5-fosfato 3-epimerasa; (10) ribosa 5-fosfato isomerasa; (11)* PRK. Las enzimas que catalizan reacciones irreversibles de acuerdo con Bassham y Krause (1969), están indicadas por (*) (Fridlyand y Scheibe, 1999).

La reacción catalizada por fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa), es el punto de ramificación importante donde parte de los metabolitos abandonan el ciclo de Calvin en forma de fructosa 6-P y se usan en la biosíntesis del almidón (Tamoi et al., 2005).

6.1.2 Síntesis del almidón transitorio

La vía de síntesis de almidón en las hojas comienza con la producción del donante de glucosilo ADP glucosa (ADPGlc), que está vinculado directamente al Ciclo de Calvin a través de tres pasos enzimáticos (Figura 6). La fructosa-6-fosfato (Fru6P), que proviene del Ciclo de Calvin, se convierte en glucosa-1-fosfato (Glu1P) por las acciones secuenciales de las enzimas fosfogluoisomerasa (PGI) y fosfoglucomutasa (PGM). La ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa) genera ADP

glucosa a partir de glucosa-1-fosfato y ATP, liberando pirofosfato inorgánico (PPi) (Stitt y Zeeman, 2012).

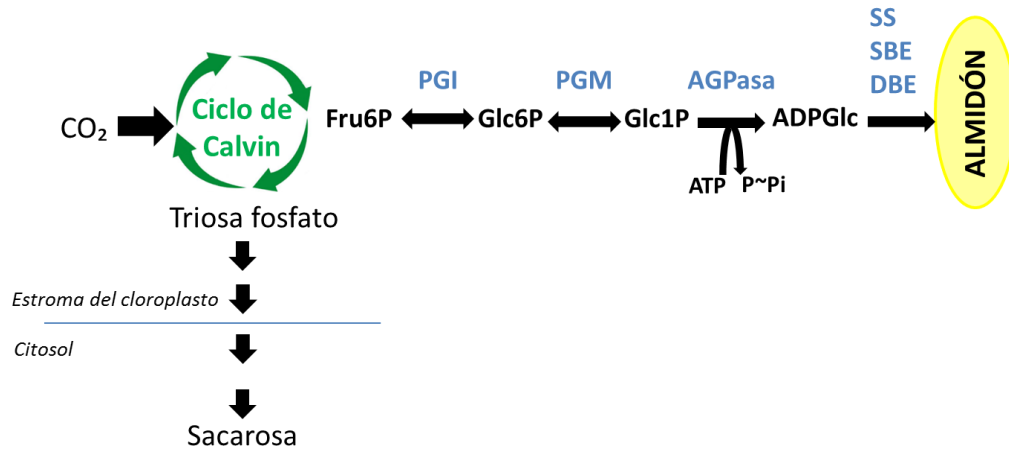


Fig. 6. Ruta de la biosíntesis del almidón en el estroma del cloroplasto. PGI, fosfoglucosa isomerasa; PGM, fosfoglucomutasa; AGPasa, ADP glucosa pirofosforilasa; SS, almidón sintasa; SBE, enzima ramificadora; DBE, enzima desramificadora; Glc-1-P, glucosa-1-fosfato (Zeeman et al., 2007).

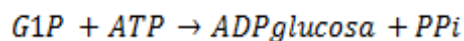
Los pasos subsecuentes, catalizados por las almidón sintasas, las enzimas ramificadoras y las enzimas desramificadoras, se mencionarán después con mayor detalle.

6.1.2.1 ADP glucosa pirofosforilasa (AGPasa)

En plantas dicotiledóneas, la AGPasa se encuentra en los cloroplastos, el sitio de fijación del CO₂. La enzima es un tetrámero formado por 2 subunidades grandes (AGPL) y 2 subunidades pequeñas (AGPS) ($\alpha_2\beta_2$) (Figura 7) (Cakir et al., 2015).

Es activada por el glicerato-3-fosfato (3-PGA), que es el producto inmediato de la fijación de CO₂; mientras que el fosfato inorgánico (Pi) es un inhibidor efectivo (Cakir et al., 2015).

La AGPasa cataliza la formación de ADP glucosa, a partir de glucosa 1-fosfato (G1P) y ATP según la siguiente ecuación (Nakamura, 2015):



Esta reacción proporciona el sustrato para el alargamiento de la cadena del α -glucano del almidón (MacNeill et al., 2017).

La síntesis y degradación de α -glucanos se regula estrictamente, y dado que la AGPasa cataliza el primer paso comprometido en la vía biosintética del almidón, su actividad está sujeta a varios mecanismos reguladores (Figura 7) (Cakir et al., 2015).

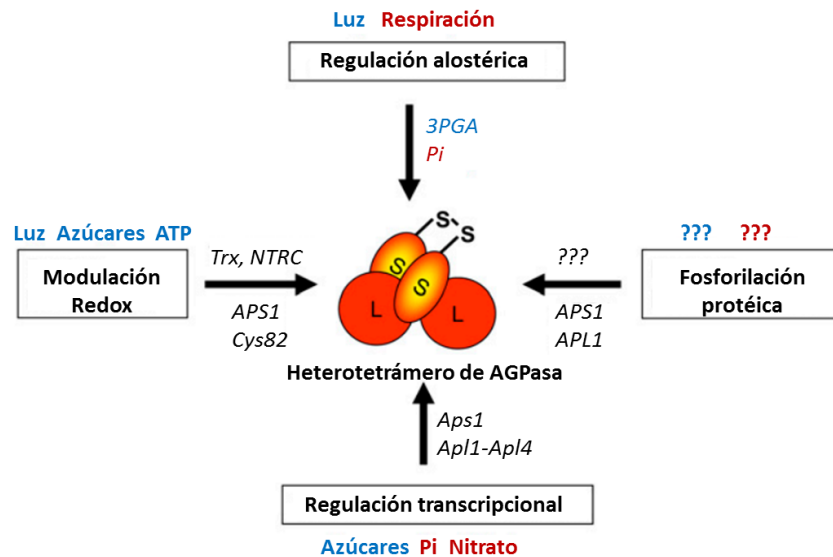


Fig. 7. Mecanismos de regulación de la AGPasa plastidial. La fuente roja indica inhibición, la fuente azul indica activación y los signos de interrogación indican elementos desconocidos (Modificado de Geigenberger, 2011).

6.1.2.1.1 Tipos de regulación de la AGPasa

a. Regulación alostérica

La regulación alostérica por medio de 3PGA y Pi, opera para equilibrar la síntesis de sacarosa y almidón en las hojas durante el periodo de luz (Geigenberger, 2011). Durante la fotosíntesis activa, el 3-PGA se convierte en triosa fosfato que puede incorporarse al ciclo de Calvin o exportarse al citoplasma, donde es precursor de la síntesis de sacarosa. Si la síntesis de sacarosa no es lo suficientemente rápida, en el cloroplasto se incrementa la concentración de 3-PGA, lo que estimula la actividad de la AGPasa y la síntesis de almidón. Un subproducto importante de la vía metabólica que conduce a la síntesis de sacarosa es el Pi, que regresa al plastidio a través del intercambiador triosa fosfato/Pi para apoyar la síntesis de ATP (Cakir et al., 2015).

Si baja la actividad fotosintética, el nivel de Pi se incrementa dentro del cloroplasto, se inhibe la actividad de AGPasa y se reduce la síntesis de almidón (Geigenberger, 2011).

b. Modulación redox postraducciona

Esta regulación implica la formación de enlaces disulfuro reversibles entre las cys⁸² (equivalente a las cys¹² de la proteína madura) de las dos subunidades pequeñas de la AGPasa. Esta modificación reduce la actividad de la AGPasa y forma parte de los mecanismos que regulan la síntesis de almidón en respuesta a luz y azúcares (Geigenberger, 2011).

Los estudios de marcaje químico han mostrado que la tiorredoxina (Trx) puede reducir un puente disulfuro que se forma entre las cys¹² de las dos subunidades pequeñas y promover la activación de la AGPasa (Cakir et al., 2015).

c. Fosforilación

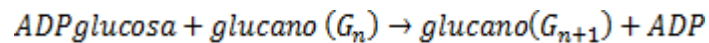
En las hojas de *Arabidopsis*, se ha observado que tanto las subunidades AGPL como las AGPS de la enzima son fosforiladas reversiblemente. Sin embargo, se necesitan más estudios para establecer la relevancia *in vivo* de este mecanismo (Geigenberger, 2011).

d. Regulación transcripcional

En respuesta a un incremento en el suministro de carbono y nutrientes, la actividad de la AGPasa, aumenta gradualmente. Este proceso involucra cambios en la expresión de los RNA mensajeros que codifican para las subunidades y puede requerir hasta días para completarse (Geigenberger, 2011). De esta manera, el aumento en la actividad de la AGPasa permitirá utilizar los incrementos en las concentraciones de G1P y ATP en la producción de ADPglucosa, que entonces favorecerá la síntesis de almidón (Blennow, 2004).

6.1.2.2. Almidón sintasas (SS)

La síntesis de almidón consiste en el alargamiento de una cadena de glucano mediante la transferencia de las unidades de glucosa provenientes de la ADPglucosa a su extremo no reductor de acuerdo con la siguiente ecuación (Nakamura, 2015):



El residuo de glucosa de ADP-glucosa se une mediante un enlace α -(1,4), liberando ADP como subproducto.

Esta reacción es catalizada por 5 tipos de almidón sintasas clasificadas en 2 grupos: las solubles (SS) I, II, III, IV y la unida al gránulo de almidón (GBSS) (Smith, 2012).

Las cadenas de amilopectina son alargadas por las cuatro SS, mientras que la amilosa es elongada por la almidón sintasa unida al gránulo de almidón (GBSS), que está atrapada dentro del gránulo (MacNeill et al., 2017).

6.1.2.2.1 El papel de las almidón sintasas

Las mutantes en maíz, arroz, cebada, trigo, papa, sorgo, amaranto, guisante, e incluso las algas verdes unicelulares *Chlamydomonas reinhardtii* que carecen de GBSS sintetizan almidón libre de amilosa. Esto puede tomarse como una clara indicación de que GBSS es responsable de su síntesis (Kossmann y Lloyd, 2000).

Hasta donde se sabe, las isoformas SSI, SSII y SSIII contribuyen a la determinación de la longitud de la cadena de glucano de amilopectina (D'Hulst et al., 2015).

La supresión casi completa de la expresión de SSI en plantas de papa no produce cambios detectables en el metabolismo del almidón. Su ausencia tampoco reduce la cantidad de almidón o el contenido de fosfato; ni modifica la relación amilosa / amilopectina, o la distribución de la longitud de las cadenas de glucano en la

fracción de amilopectina. Como consecuencia, su ausencia no modifica las propiedades físicas del almidón (Kossmann y Lloyd, 2000).

También en tubérculos de papa, se observó que la eliminación casi completa de la expresión de SSII tuvo efectos muy pequeños sobre el metabolismo del almidón. En este caso, tampoco se redujo la cantidad de almidón sintetizado. Se estima que la SSII aporta el 15% de la actividad total de las almidón sintetas solubles en los tubérculos de papa, lo que podría explicar que su ausencia tenga efectos muy sutiles sobre las propiedades del almidón (Kossmann y Lloyd, 2000).

Por otro lado, se ha observado que los cloroplastos de plantas de *Arabidopsis* que no expresan SSIV acumulan uno o dos gránulos de almidón, cuando generalmente en las plantas silvestres se observan 5-7 gránulos (Roldán et al. 2007). Este fenotipo indica que SSIV tiene un papel muy importante en la iniciación de los gránulos de almidón. Si bien la ausencia de SSIV no afecta la estructura de la amilopectina (D'Hulst et al., 2015), sí induce la acumulación de ADP glucosa, e indirectamente conduce al estrés foto-oxidativo y reduce el crecimiento vegetal (Ragel et al. 2013).

6.1.2.3. *Enzimas ramificadoras (SBE)*

Posterior a la acción de las enzimas almidón sintetas, las enzimas ramificadoras de almidón (SBE) introducen puntos de ramificación; para ello rompen enlaces α -(1,4) y reinsertan cadenas cortas provenientes de la misma cadena o de una cadena vecina a través de los enlaces glicosídicos α -(1,6) (MacNeill et al., 2017).

La cadena transferida se deriva de la cadena donadora escindiendo la parte no reductora, y a la parte restante se le denomina cadena residual (Figura 8). Cuando las SBE usan una cadena receptora diferente de la cadena donadora, la reacción se denomina “ramificación inter-cadena”, mientras que en la “ramificación intra-cadena”, las SBE utilizan la misma cadena como donadora y como receptora. En ambos casos, el número total de cadenas aumenta mientras que el de los residuos de glucosa no cambia (Nakamura, 2015).

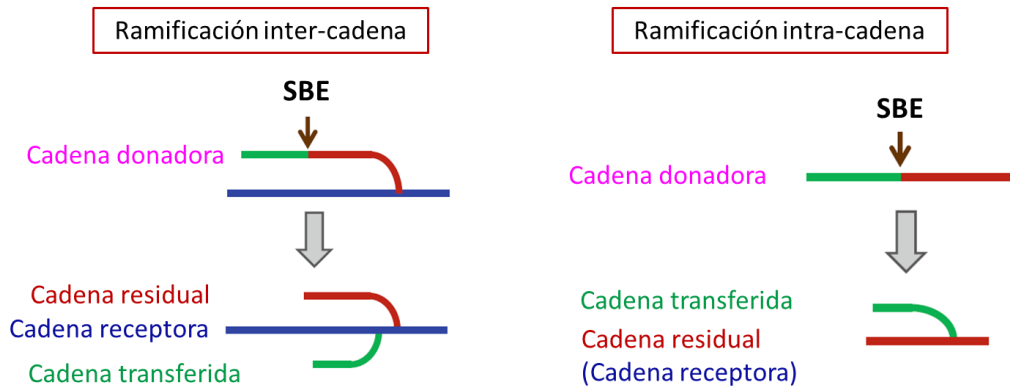


Fig. 8. Reacción de ramificación de un α -glucano catalizada por la enzima ramificadora (SBE). Después de la reacción enzimática de SBE, el número de cadenas aumenta mientras que el número de residuos de glucosa no cambia por la reacción de ramificación inter-cadena ni por la reacción intra-cadena (Modificado de Nakamura, 2015).

6.1.2.4. Enzimas desramificadoras (DBE)

Finalmente, las enzimas desramificadoras (DBE) catalizan la eliminación de ramas innecesarias para que la amilopectina adquiera su estructura definitiva (Nakamura, 2015). En la Figura 9, se presenta de manera esquemática la acción de estas tres enzimas para la formación del gránulo de almidón.

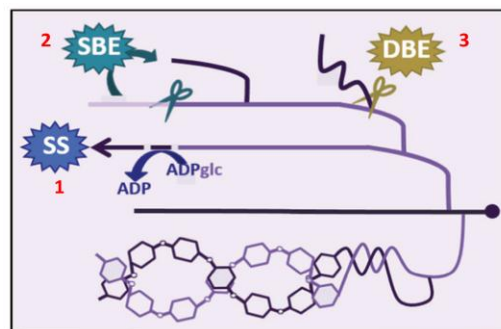


Fig. 9. Enzimas que participan en la síntesis de almidón. Las cadenas lineales de α -glucano se alargan mediante almidón sintetas (SS) que catalizan la incorporación de la unidad de glucosa de ADP-Glc, en el extremo no reductor de las cadenas de glucano existentes mediante la formación de enlaces α -(1,4) glicosídicos. Posteriormente, los puntos de ramificación se crean a través de enlaces glicosídicos α -(1,6) por medio de las enzimas ramificadoras de almidón (SBE). Para acomodar la estructura organizada dentro de los paquetes de amilopectina, el exceso de ramificación se recorta mediante enzimas desramificadoras (DBE, isoamilasas) (Modificado de MacNeill et al., 2017).

Las plantas tienen dos tipos de enzimas desramificadoras de α -glucanos: isoamilasas (ISA, EC 3.2.1.68) y pululanazas (PUL, EC 3.2.1.41). Tanto ISA como PUL son capaces de romper el enlace glicosídico α -1,6. (Nakamura, 2015).

En una condición fisiológica definida, la estructura de amilopectina está determinada por el equilibrio entre las reacciones de elongación de cadena (catalizadas por SS) y de ramificación de cadena (catalizadas por SBE), mientras que DBE elimina las ramas que obtaculizan alcanzar la estructura de empaquetamiento (Nakamura, 2015).

De esta manera, la amilopectina se sintetiza básicamente mediante acciones coordinadas de tres clases de enzimas, SS, SBE y DBE, mientras que la amilosa es sintetizada principalmente por GBSS (Figura 10). Sin embargo, la regulación de la síntesis de almidón es compleja porque cada clase de enzimas tiene múltiples isoenzimas con propiedades distintas (Nakamura, 2015).

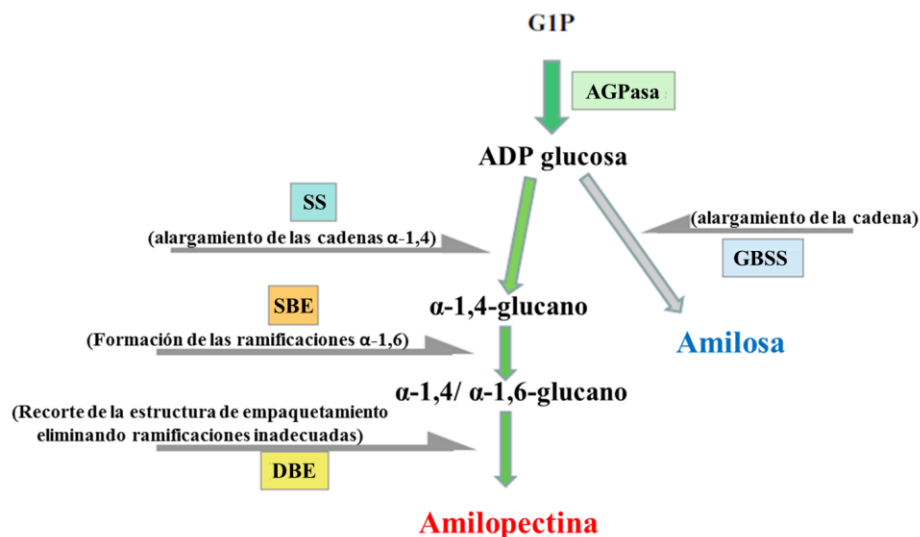


Fig. 10. La ruta de la síntesis de almidón a partir de G1P. (Modificado de Nakamura, 2015).

6.1.3 Degradación del almidón transitorio

El proceso de degradación del almidón transitorio se representa en el esquema que aparece en la Figura 11. El proceso debe controlarse con precisión para satisfacer las necesidades metabólicas de la planta durante la noche (Smith, 2012). De acuerdo con esta propuesta, la enzima glucan agua dicinasa (GWD), agrega el grupo β -fosfato del ATP al carbono 6 de un residuo de glucosilo de amilopectina ubicado en la superficie del gránulo (Zeeman et al., 2007). Esta modificación es necesaria para la degradación eficiente del almidón en las hojas de papa y de *Arabidopsis* (Smith et al., 2005).

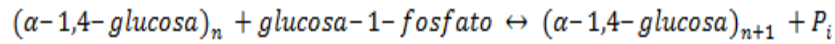
La enzima PWD (fosfoglucono-agua dicinasa) tiene una secuencia de aminoácidos similar a la de la enzima GWD y es responsable de la fosforilación en la posición C3 de los residuos de glucosilo de la amilopectina. Para ello es necesario que el glucano ya esté fosforilado, es decir, depende de la acción previa de GWD (Zeeman et al., 2007). El gránulo de almidón tiene una estructura muy compacta e hidrofóbica y la fosforilación de los residuos de glucosa ubicados en su superficie facilita el ataque por enzimas amilolíticas.

6.1.3.1 *Metabolismo de glucanos en la superficie del gránulo de almidón*

Las α -amilasas son enzimas endoamilolíticas y, por lo tanto, tienen la capacidad de romper los enlaces α -1,4 en el interior de las moléculas de amilosa y amilopectina. Catalizan la hidrólisis de los enlaces α -1,4 y tienen un papel importante en la degradación del almidón durante la germinación de semillas (Kossmann y Lloyd, 2000). Sin embargo, en *Arabidopsis* su actividad no es necesaria para la degradación del almidón transitorio que se acumula en las hojas. Lo que significa que otras enzimas deben participar en el proceso. Las β -amilasas son exoamilasas que hidrolizan enlaces α -1,4 y producen maltosa; actúan en sinergia con las enzimas desramificadoras (que hidrolizan los enlaces glicosídicos α -1,6) para cumplir esta función (Zeeman et al. 2007). Las β -amilasas están estéricamente impedidas para hidrolizar regiones muy cercanas a los puntos de ramificación de la amilopectina, lo que genera una estructura con ramificaciones cortas en la superficie del gránulo. La enzima desramificadora isoamilasa 3 (ISA3), hidroliza los enlaces glicosídicos α -1,6, liberando malto-oligosacáridos pequeños y permitiendo la acción continua de la β -amilasa. Esto explica porque los productos principales de la degradación del almidón transitorio son maltosa y malto-oligosacáridos lineales (Zeeman et al., 2007).

6.1.3.2 Metabolismo de maltooligosacáridos

La α -glucan fosforilasa (EC 2.4.1.1) cataliza la siguiente reacción reversible (Smirnova et al., 2015):



Las plantas superiores tienen dos fosforilasas: una plastídica y otra citosólica. La plastídica, también denominada Pho1, PhoL o PHS1, tiene una inserción de 78 aminoácidos cerca del sitio de unión del glucano; muestra baja afinidad por el glucógeno, pero es muy afín por los glucanos lineales (especialmente los maltooligosacáridos). Por su parte, la enzima citosólica, denominada Pho2, PhoH o PHS2, prefiere sustratos ramificados como el glucógeno o la amilopectina (Pfister y Zeeman, 2016).

La enzima glucan fosforilasa (PHS1), cataliza la degradación de los glucanos liberados por las enzimas desramificadoras como la enzima ISA3 (Fig. 11) (Smith et al., 2005). La β -amilasa puede metabolizar eficientemente oligosacáridos de más de 4 residuos de glucosilo de longitud, pero la maltotriosa es un sustrato pobre, por lo que estas moléculas se acumulan (Zeeman et al., 2007). Por otro lado, la actividad de ISA3 sobre la superficie del gránulo de almidón también puede liberar maltotriosa (Zeeman et al., 2007).

La enzima α -1,4 glucanotransferasa (DPE1), puede metabolizar maltotriosa eficientemente. Esta proteína está ubicada en el cloroplasto, y puede convertir dos moléculas de maltotriosa en una maltopentaosa y otra de glucosa (Smith et al., 2005). *In vivo*, la glucosa producida de esta manera podría ser exportada desde el cloroplasto por el transportador de glucosa, y la maltopentaosa podría servir como sustrato para la β -amilasa, resultando en maltosa y maltotriosa (Zeeman et al., 2007).

6.1.3.3 Metabolismo de maltosa

La maltosa es el principal producto de la degradación del almidón y el transportador de maltosa (MEX1) la exporta del cloroplasto al citosol durante la noche (Chia et al., 2004; Smith et al., 2005).

En el citosol la maltosa es hidrolizada por la α -glucosidasa, y la glucosa resultante es fosforilada por la hexocinasa. Sin embargo, en el citosol la maltosa también se metaboliza a través de una reacción de transglucosilación catalizada por la transglucosidasa DPE2 (Figura 11). En esta reacción, un residuo de glucosilo se transfiere a una molécula aceptora, al mismo tiempo que se libera otra molécula de glucosa. La glucosa liberada por DPE2 puede ser fosforilada por la hexocinasa y entrar en la reserva de hexosas-fosfato, mientras que el residuo de glucosilo transferido al aceptor citosólico podría ser liberado como glucosa-1-fosfato por la enzima PHS2 y esta glucosa-1-fosfato estaría disponible para la síntesis de sacarosa (Zeeman et al., 2007). El hecho de que el perfil de expresión de la PHS2 sea el mismo que el de la DPE2 y otras enzimas que se sabe que participan en la degradación del almidón, apoya esta hipótesis (Smith et al., 2004).

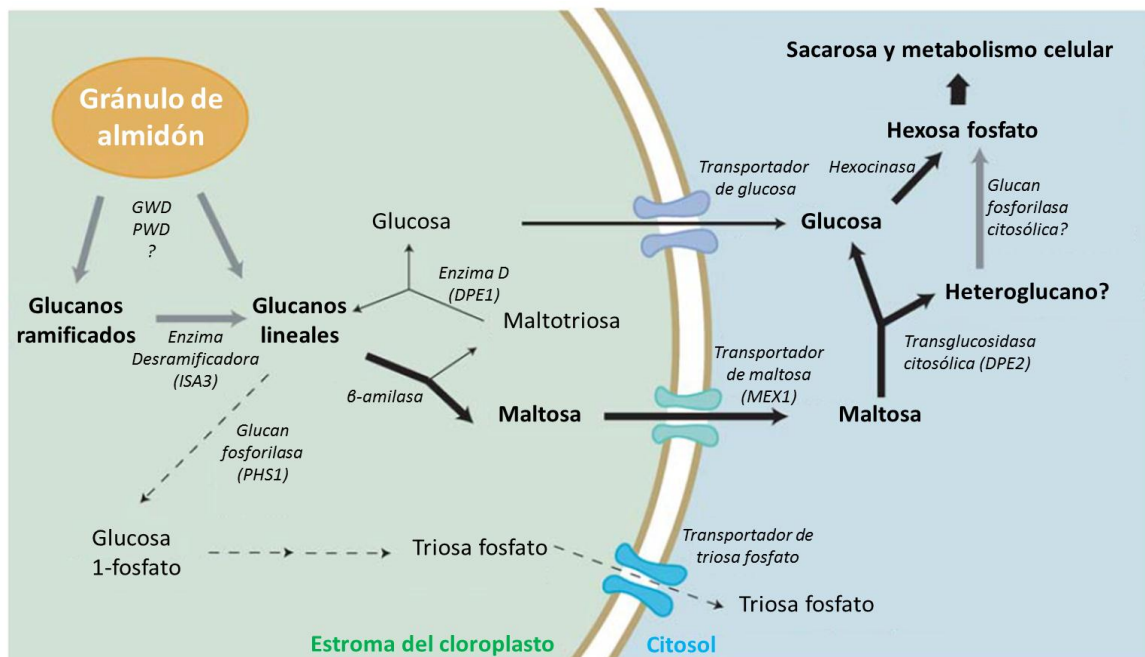


Fig. 11. Ruta propuesta de la degradación del almidón en las hojas de Arabidopsis durante la noche. Los pasos sobre los que aún hay incertidumbre, se representan como flechas punteadas o discontinuas, y con signos de interrogación. GWD: glucan agua dicinasa. PWD: fosfoglucon agua dicinasa (Smith et al., 2005).

6.2 METABOLISMO DEL ALMIDÓN DE RESERVA

6.2.1 Síntesis del almidón de reserva

Los amiloplastos de los órganos de reserva se caracterizan por una alta tasa de producción de almidón a partir de sacarosa. Las principales diferencias entre el metabolismo del almidón transitorio y el de reserva son las siguientes (Nakamura, 2015):

1. El donador de C usado para síntesis de ADPglucosa.

En los cloroplastos, la fructosa 6-P, producto del ciclo de Calvin, se convierte primero en glucosa 6-P y luego en glucosa 1-P. Posteriormente, la enzima AGPasa convierte la glucosa 1-P en ADPglucosa.

En los amiloplastos de los órganos de reserva, el almidón se sintetiza a partir de la sacarosa, que se transloca desde las hojas mediante el floema (Nakamura, 2015). La sacarosa entra en el citosol a través de transportadores específicos (AtSUCs), donde es degradada por la sacarosa sintasa para formar UDPglucosa y fructosa. Posteriormente, la UDPglucosa pirofosforilasa (UGPasa) convierte la UDPglucosa en glucosa 1-P. En los cereales, la glucosa 1-P se utiliza principalmente como sustrato para la reacción de síntesis de ADPglucosa catalizada por una AGPasa citosólica. La ADPglucosa se transporta luego a los amiloplastos a través del transportador de ADPglucosa, a veces denominado proteína Brittle1. En dicotiledóneas, las hexosas fosforiladas (glucosa 1-P o glucosa 6-P) entran al amiloplasto y posteriormente son convertidas en ADPglucosa (Nakamura, 2015).

2. El suministro de ATP.

En el cloroplasto, el ATP requerido para la síntesis del almidón transitorio proviene de las reacciones de fotofosforilación; mientras que en el amiloplasto, es importado del citosol por el intercambiador ATP/ADP.

3. Los tipos de translocadores / transportadores que funcionan en las células no fotosintéticas son diferentes de los de las células fotosintéticas.

Mientras que los cloroplastos contienen todas las enzimas y cofactores necesarios para la biosíntesis del almidón, los amiloplastos de las células no fotosintéticas, necesitan de muchos translocadores / transportadores para allegarse los metabolitos y cofactores necesarios (Cakir et al., 2015).

4. Regulación.

Las propiedades reguladoras de la AGPasa (y posiblemente de otras enzimas implicadas en la síntesis de almidón), que están presentes en las células fotosintéticas, son diferentes a las de las células no fotosintéticas.

La regulación de las actividades de AGPasa y, a su vez, la síntesis de almidón en plantas superiores está bajo estricto control. En las hojas, la AGPasa se encuentra en los cloroplastos, el sitio de fijación del CO_2 . Durante la fotosíntesis activa, el 3-PGA se produce y se convierte en triosa fosfato, que puede volver a entrar en el ciclo de Calvin o exportarse al citoplasma, donde actúa como precursor de la síntesis de sacarosa. Un subproducto importante de la vía metabólica que conduce a la síntesis de sacarosa es el Pi, que puede reciclarse de nuevo en el plastidio a través del translocador de Pi para apoyar la síntesis de ATP. La proporción 3-PGA / Pi en el cloroplasto permite la coordinación de la síntesis de almidón en este orgánulo y la síntesis de sacarosa en el citoplasma de acuerdo a las necesidades de la célula (Cakir et al., 2015).

A diferencia de las AGPasas de hojas y tallos, que son activadas e inhibidas por 3-PGA y Pi, respectivamente, las enzimas de las semillas en desarrollo muestran una variación considerable en su dependencia de la activación de 3-PGA. Las AGPasas de trigo no dependen de 3-PGA para una actividad catalítica máxima, pero son inhibidas alostéricamente por Pi, ADP y fructosa 1,6-bisfosfato (FBP). Aunque no tienen impacto sobre la actividad enzimática por sí solos, 3-PGA y Fru6P pueden revertir el efecto inhibitorio de Pi. Por el contrario, la AGPasa nativa del endospermo de arroz requiere 3-PGA para una actividad catalítica máxima. La principal actividad de la AGPasa en el endospermo del arroz es estimulada más

de 30 veces por 3-PGA, una activación que es revertida por el inhibidor Pi (Cakir et al., 2015).

5. La estructura del almidón

Se ha observado que la cristalinidad de los almidones purificados de hojas es diferente de la obtenida de los órganos de almacenamiento de cereales y leguminosas. En el almidón de hojas las dobles hélices de amilopectina interactúan con las moléculas de agua dentro de los cristales de almidón, lo que resulta en una organización más relajada, mostrando la forma B en comparación con los cereales o las leguminosas, que muestran la forma A y la forma C, respectivamente (D'Hulst et al., 2015).

El contenido relativo de agua, la densidad y la organización de las cadenas de un glucano determinan la funcionalidad general y la digestibilidad del gránulo. Las cadenas de tipo B son más fáciles de digerir y permiten una rápida renovación, mientras que las cadenas de tipo A son más propicias para el almacenamiento a largo plazo en semillas secas (MacNeill, et al., 2017).

6. Enzimas participantes

Las enzimas que contribuyen a la síntesis y a la degradación del almidón son numerosas y algunas de ellas tienen diferentes isoformas con diferentes patrones de expresión y en algunos casos con localización variable (Tabla 4). Esto hace que el análisis de su participación en el metabolismo del almidón sea complejo (Nakamura et al. 1989; Smith et al. 2004).

Tabla 4. Enzimas que participan en la síntesis y degradación de almidón en *Arabidopsis thaliana* (Smith et al., 2004).

SÍNTESIS		DEGRADACIÓN	
Fosfoglucoisomerasa	PGI1	Glucan agua dicinasa 1	GWD1, SEXI
Fosfoglucomutasa	PGM1	Proteína tipo Glucan agua dicinasa 2	GWD2
ADP-glucosa pirofosforilasa Subunidad grande 1	APL1	Proteína tipo Glucan agua dicinasa 3	GWD3
ADP-glucosa pirofosforilasa Subunidad grande 2	APL2	Fosfoglucan agua dicinasa	PWD
ADP-glucosa pirofosforilasa Subunidad grande 3	APL3	Glucanotransferasa	DPE1
ADP-glucosa pirofosforilasa Subunidad grande 4	APL4	Transglucosidasa	DPE2
ADP-glucosa pirofosforilasa Subunidad pequeña	APS1	α -amilasa 1	AMY1
ADP-glucosa pirofosforilasa Proteína tipo subunidad pequeña	APS2	α -amilasa 2	AMY2
Almidón sintasa 1	STS1	α -amilasa 3	AMY3
Almidón sintasa 2	STS2	β -amilasasa 1	BAM1, BMY7
Almidón sintasa 3	STS3	β -amilasasa 2	BAM2, BMY9
Almidón sintasa 4	STS4	β -amilasasa 3	BAM3, BMY8, ctBMY
Almidón sintasa unido al gránulo	GBS1	β -amilasasa 4	BAM4
Proteína tipo Glucan sintasa	GLS1	β -amilasasa 5	BAM5, BMY1, RAM1
Enzima ramificadora 1	SBE1	β -amilasasa 6	BAM6
Enzima ramificadora 2	SBE2	β -amilasasa 7	BAM7
Enzima ramificadora 3	SBE3	β -amilasasa 8	BAM8
Isoamilasa 1	ISA1	β -amilasasa 9	BAM9, BMY3
Isoamilasa 2	ISA2	Isoamilasa 3	ISA3
		Pululanasa	PUL1
		Glucan fosforilasa (cloroplástica)	PHS1
		Glucan fosforilasa (citosólica)	PHS2
		Proteína tipo α -glucosidasa 1	AGL1
		Proteína tipo α -glucosidasa 2	AGL2
		Proteína tipo α -glucosidasa 3	AGL3
		Proteína tipo α -glucosidasa 4	AGL4
		Proteína tipo α -glucosidasa 5	AGL3

6.2.2 Degradación del almidón de reserva

Durante la germinación de los granos de cereales, la degradación del gránulo de almidón es catalizada principalmente por la endoamilasa α -amilasa; y no hay evidencia de que se requiera la fosforilación de moléculas de glucosa en la superficie del gránulo (Smith, 2012). No hay compartimentalización subcelular en el endospermo, y tampoco evidencias de que el proceso esté sujeto a un control muy estricto.

7. EL PAPEL DE LAS ENZIMAS DESPROPORCIONADORAS EN EL METABOLISMO DEL ALMIDÓN

Las plantas tienen dos tipos de enzima D, una localizada en el cloroplasto, enzima desproporcionadora 1 (DPE1) y otra en el citoplasma, enzima desproporcionadora 2 (DPE2). Ambas pertenecen a la familia 77 de las glicosido hidrolasas (GH77); sin embargo tienen diferentes patrones de expresión, estructura proteica y propiedades de reacción.

Durante la noche la participación de la β -amilasa y la isoamilasa en la degradación del almidón acumulado en las hojas genera maltosa y maltooligosacáridos. Los maltooligosacáridos de menos de cuatro unidades de glucosa no son sustratos de estas enzimas, y al no poder ser exportados, se acumularían en el cloroplasto. La enzima DPE1 puede solucionar este problema (Møller y Svensson, 2016). Esta enzima tiene actividad de α -1,4-glucanotransferasa y cataliza la ruptura de los enlaces α -1,4-glicosídicos de glucanos, y dependiendo del sitio de corte, transfiere los grupos glicosilos al extremo no reductor de otro glucano y libera glucosa o una cadena de glucano (Figura 12). Los principales sustratos para DPE1 son la maltotriosa y los maltooligosacáridos (MOSs) de cadena larga.

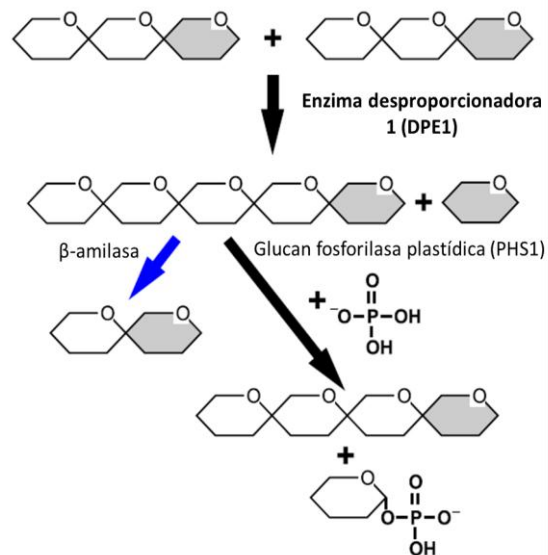


Fig. 12. Acción de la enzima DPE1 en maltotriosa. (Møller y Svensson, 2016).

Critchley y cols. (2001) demostraron que la enzima DPE1 es necesaria para la degradación normal del almidón, y proponen que, durante la degradación del almidón en las hojas de *Arabidopsis*, la enzima D cataliza la desproporción de las pequeñas moléculas de maltooligosacáridos (particularmente maltotriosa), en otras más grandes, sobre las que podrían actuar la β -amilasa y la almidón fosforilasa, produciendo glucosa y glucosa-1-fosfato como productos finales (Critchley et al., 2001).

Por su parte, la enzima DPE2 ha sido identificada por la similitud de su secuencia con DPE1, y su función ha sido caracterizada tanto en *Arabidopsis* como en papa (Bresolin et al., 2006). La maltosa parece ser el sustrato más efectivo y DPE2 cataliza la transferencia de una unidad de glucosa de la molécula de maltosa a un polisacárido, liberando así la otra molécula de glucosa (Figura 13). *In vitro*, el glucógeno, la amilopectina y los oligosacáridos funcionan como aceptores del residuo de glucosilo transferido (Zeeman et al., 2007). Considerando estas características, se ha propuesto que la enzima DPE2 es una α -1,4-glucosiltransferasa más que una α -1,4-glucanotransferasa (Dong et al., 2015).

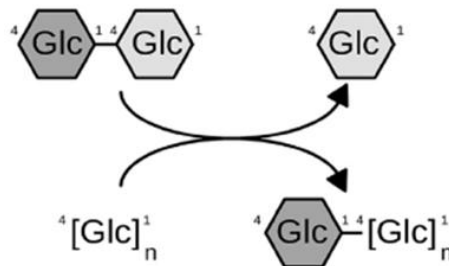


Fig. 13. Acción de la enzima DPE2. (Modificado de Smirnova et al., 2017).

La actividad de DPE2 está implicada en el metabolismo de la maltosa exportada al citosol por medio del transportador MEX1. Su participación permite que la maltosa sea convertida en hexosas fosfato usadas en distintos procesos metabólicos; o bien utilizada como sustrato para la síntesis de sacarosa que se exporta al resto de la planta; su ausencia provoca deficiencia en la degradación de almidón durante la noche y la acumulación de altos niveles de maltosa en las hojas (Chia et al., 2004). Todo ello indica que DPE2 es la ruta más importante para metabolizar la maltosa proveniente del cloroplasto (Smith et al., 2005).

8. PRESENCIA DE DPEs EN LA VAINA DEL FRIJOL

La formación de semillas es un proceso que demanda grandes cantidades de recursos metabólicos. Con frecuencia esa etapa es afectada por condiciones ambientales adversas que reducen la disponibilidad de fotosintatos (Cuellar-Ortiz et al., 2008).

Las plantas de frijol usan la removilización del almidón acumulado en la vaina de sus frutos como parte de las estrategias de resistencia a la sequía (Cuellar-Ortiz et al., 2008). El conocimiento del metabolismo del almidón bajo estas circunstancias permitirá la selección de genotipos que toleren de la mejor manera los efectos negativos de condiciones ambientales adversas. Por lo tanto, el estudio de las enzimas que participan en la degradación del almidón; entre ellas la enzima desproporcionadora 2 (DPE2), es muy importante.

8.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Las secuencias de las enzimas DPE1 y DPE2 de *Arabidopsis thaliana* (Lin y Preiss, 1988; Critchley et al., 2001), fueron recuperadas de la base TAIR (At5g64860 para DPE1 y At2g40840 para DPE2); y mediante la herramienta BLAST fueron usadas en la base de datos Phytozome para obtener sus homólogos en frijol. Posteriormente, se usó la herramienta ClustalW para la comparación de secuencias. Además, se realizó un cálculo aproximado del peso molecular de cada una de estas proteínas mediante la herramienta Sequence Manipulation Suite: Protein Molecular Weight.

Estos análisis revelaron que el gen Phvul.009g139500.1 de *Phaseolus vulgaris* codifica para DPE1; mientras que DPE2 está codificada por los genes Phvul.001g117500.1 y Phvul.001g117700.1 (Tabla 5).

Tabla 5. Genes que codifican las enzimas DPE de *Phaseolus vulgaris* y *Arabidopsis thaliana*

Alineamiento	Gen en <i>Phaseolus vulgaris</i>	Gen en <i>Arabidopsis thaliana</i>	Enzima que codifican
1	Phvul.009g139500.1	At5g64860	DPE1
2	Phvul.001g117500.1	At2g40840	DPE2
3	Phvul.001g117700.1		

Las comparaciones de las secuencias (alineamientos) se encuentran en el anexo que aparece al final de este trabajo. Allí se puede observar que los genes Phvul.009g139500.1 y At5g64860 codifican para proteínas de tamaños y pesos moleculares similares (562 y 576 aminoácidos y pesos moleculares de 63.22 y 64.42 kDa, respectivamente). El alto grado de similitud entre las secuencias (alineamiento 1), sugiere que la proteína en cuestión (DPE1) podría tener una función similar en ambas especies. Este argumento se refuerza con el hecho de que en la base de datos Phytozome se indica que el gen Phvul.009g139500.1 se expresa abundantemente en hojas y poco en raíces; y que algo similar ocurre con At5g64860 en *Arabidopsis* (TAIR). Adicionalmente, la cantidad de exones e intrones presentes en estos genes es similar (Figura 14).

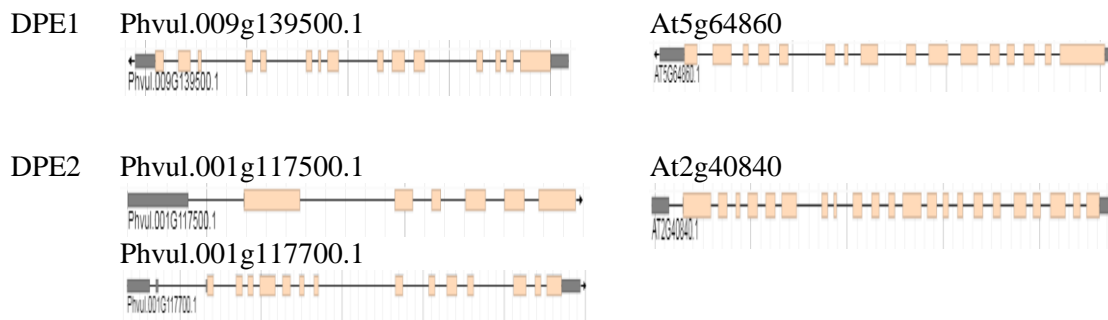


Fig. 14. Comparación de la estructura del gen de las enzimas DPE1 y DPE2 de *Phaseolus vulgaris* con los genes equivalentes en *A. thaliana*. (Cuadrados: exones, línea continua: intrones).

Usando el mismo análisis, se encontró que en *Phaseolus vulgaris* DPE2 está codificada por dos genes (Phvul.001g117500.1 y Phvul.001g117700.1). En este caso, la proteína codificada por el gen At2g40840 en *Arabidopsis* tiene 955 aminoácidos y un peso molecular de 109.79 kDa; mientras que las codificadas por los genes Phvul.001g117500.1 y Phvul.001g117700.1 poseen 338 y 600 aminoácidos y un peso molecular de 38.29 y 69.81 kDa, respectivamente. Los alineamientos que se presentan en el anexo muestran que en el primer caso, el extremo carboxilo terminal de la proteína de *Arabidopsis* es más grande, y en el otro, la diferencia está en el extremo amino terminal.

Los datos de expresión obtenidos de la base de datos Phytozome indican que los genes Phvul.001g117500.1 y Phvul.001g117700.1, se expresan abundantemente en hojas y vainas verdes maduras, y poco en flores. Por su parte, la información obtenida de TAIR indica que el gen At2g40840 se expresa abundantemente en hojas. En este caso, la organización de los genes de frijol y *Arabidopsis* es muy diferente (Figura 14).

8.2 DETECCIÓN DE LA ENZIMA DPE2 EN VAINAS DE FRUTOS DE FRIJOL

8.2.1 Metodología

Para estudiar si la cantidad de las enzimas DPE2 presente en las vainas de los frutos de frijol cambiaba durante el desarrollo de las semillas, se siguió la metodología descrita en la Figura 15.

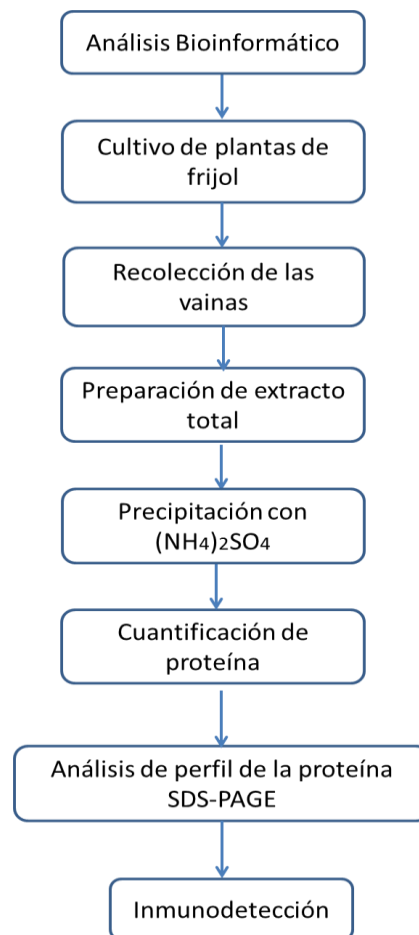


Fig. 15. Metodología usada para el estudio de los cambios en la cantidad de las enzimas DPE2 en vainas de frutos de frijol durante el desarrollo de las semillas.

8.2.1.1 *Material biológico*

Semillas de frijol del genotipo G26 se desinfectaron con una solución del cloro al 0.5% y se germinaron en papel húmedo a 25-27 °C. Las plántulas se sembraron en macetas con 3 L de agrolita y se cultivaron en el invernadero. Durante el periodo de estudio se regaron con solución nutritiva Hoagland. Las flores se etiquetaron al momento en que sus órganos estuvieron totalmente expuestos (floración) y la edad de los frutos se estableció por el número de días posteriores a ese momento (DDF). Los frutos se recolectaron a los 15, 20, 25 y 30 DDF. Después de disectarlos, las vainas se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su estudio.

8.2.1.2 *Preparación del extracto proteico*

Los extractos enzimáticos se elaboraron siguiendo un procedimiento previamente reportado (Sato et al., 2008). Muestras de aproximadamente 0.6 g se homogenizaron en mortero con nitrógeno líquido. Se agregó la solución amortiguadora de extracción compuesta de: Hepes-NaOH 50 mM (pH 7.4), MgCl₂ 4 mM, β-mercaptoetanol 50 mM, glicerol al 12.5% (v/v) y la mezcla de inhibidores de proteasas (Complete de Roche). Se usó una proporción 1:3 (tejido:solución de extracción) y el homogeneizado se centrifugó a 14000 x g durante 10 minutos.

8.2.1.3 *Precipitación con sulfato de amonio*

Los extractos proteicos obtenidos se fraccionaron por medio de precipitación con (NH₄)₂SO₄ en los intervalos de saturación 0-30% y 30-50%. Después de precipitar los extractos, éstos se dializaron (para eliminar el exceso de (NH₄)₂SO₄ en la solución), a 4 °C por 12 horas, para lo cual se utilizaron bolsas de diálisis con un corte de 10 kDa.

8.2.1.4. *Cuantificación de proteína*

La proteína se cuantificó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Se realizó una curva de calibración con una solución de albúmina sérica bovina 0.5 mg/mL. La medición de absorbancia a una longitud de onda a 595 nm se hizo en

el espectrofotómetro de placa MULTISKAN FC de Thermo SCIENTIFIC. Los resultados se graficaron y se realizó la regresión lineal de los mismos, la ecuación de la curva patrón se utilizó para obtener la concentración de las muestras en mg/mL.

8.2.1.5 *Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)*

Se preparó el gel separador de 0.75 mm de grosor, conteniendo 2.08 ml de agua, 1.67 ml de acrilamida/bis-acrilamida 30/0.8 %, 1.25 ml de solución amortiguadora Tris-HCl 3M (pH 8.8), 25 µl de SDS al 20% (dodecilsulfato sódico), 25 µl persulfato de amonio al 10 % y 5 µl TEMED (tetrametiletilendiamina). El gel apilador de 0.75 mm de grosor contenía 1.38 ml de agua, 0.5 ml de acrilamida/bis-acrilamida 30/0.8 %, 0.63 ml de solución amortiguadora Tris-HCl 0.5M (pH 6.8), 12.5 µl de SDS al 10%, 12.5 µl de persulfato de amonio al 0.05 % y 5 µl de TEMED. A las muestras (10 µg) se les adicionó solución de carga (Tris 0.12 M, SDS 4%, β mercaptoetanol al 10%, glicerol al 20%, azul de bromofenol 2 mg/ml), se incubaron a 85 °C por 5 minutos y se cargaron en el gel apilador.

La electroforesis se corrió a 100 V durante aproximadamente 3 horas hasta que el frente de corrida alcanzó el borde del gel. El gel se tiñó con azul de coomassie coloidal [CBB G-250 0.02 % (p/v); sulfato de aluminio 5 % (p/v); etanol 10 % (v/v), ácido ortofosfórico (85 %) 2 % (v/v)] y se mantuvo en agitación durante un periodo de 12 horas. Pasado este tiempo, el gel se destiñó con la solución de desteñido [etanol 10 % (v/v) y ácido ortofosfórico 2 % (v/v)] y se documentó en el equipo ChemiDoc (Bio-Rad).

8.2.1.6. *Inmunodetección de la enzima desproporcionadora*

Para evaluar la presencia de las enzimas desproporcionadoras en las vainas de los frutos de frijol, se hizo un ensayo de inmunodetección utilizando un anticuerpo policlonal desarrollado contra la enzima DPE2 de *Arabidopsis*. Este anticuerpo fue elaborado por el grupo de la Dra. Patricia Coello y generosamente compartido para la realización de este trabajo.

Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE y posteriormente se transfirieron una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) durante una hora con 15 minutos a 100 V en la solución de transferencia con pH 8.3 (Tris-HCl 25 mM, glicina 96 mM, metanol 20%, SDS al 20 %). Posteriormente, la membrana se incubó durante una hora a temperatura ambiente con agitación en una solución de leche descremada al 5% (p/v) en el amortiguador salino TBS-T (Tris-HCl 10 mM, pH 7.6; NaCl 0.14 M; tween 20 al 0.1%). Se agregó el anticuerpo primario anti-DPE2 diluido 1:5000 y se incubó con agitación constante a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se hicieron cuatro lavados de 15 minutos cada uno con el amortiguador TBS-T; y se incubó con agitación constante a temperatura ambiente durante una hora en el amortiguador TBS-T con el anticuerpo secundario diluido 1:20,000. Finalizado este tiempo, se hicieron cuatro lavados de 15 minutos con el amortiguador TBS-T y la membrana se reveló con el reactivo quimioluminiscente Immobilon Western de Millipore, sustrato de la enzima peroxidasa. El resultado fue visualizado en el equipo ChemiDoc (Bio-Rad).

8.2.2 Resultados

Se determinó la cantidad de proteína presente en las muestras y se ajustaron los volúmenes para cargar la misma cantidad en los geles. El gel que se obtuvo se muestra en la Figura 16.

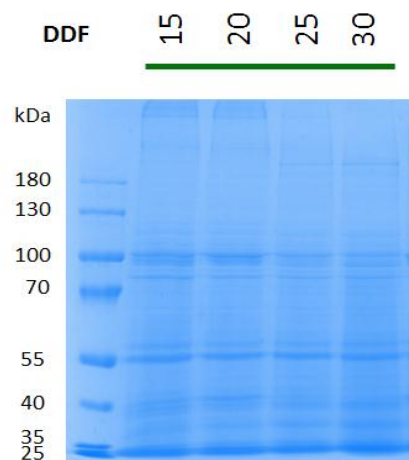


Fig. 16. Electroforesis SDS-PAGE de las muestras de vaina de frijol de diferentes edades. El gel se tiñó con Coomassie coloidal (DDF: Días después de la floración).

Mediante un ensayo de inmunodetección los anticuerpos contra la enzima DPE2 reconocieron una proteína de 60 kDa, cuya intensidad es más fuerte en la muestra de 20 DDF (Figura 17).

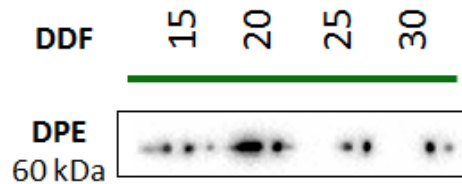


Fig. 17. Inmunodetección de la enzima DPE2 en los extractos de vainas de frutos de frijol. DDF: días después de la floración.

La proteína DPE2 es poco abundante en los extractos de vaina. Con el propósito de enriquecer los extractos y facilitar la realización de análisis posteriores, se hizo una precipitación con sulfato de amonio; esta sustancia reduce la solubilidad de las proteínas; las proteínas precipitadas se pueden recuperar por centrifugación, lo que facilita su concentración (Wingfield, 2001). El análisis de las proteínas recuperadas se muestra en la Figura 18.

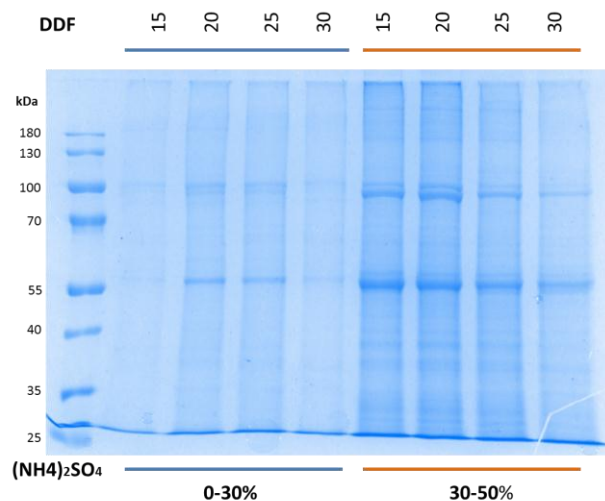


Fig. 18. Electroforesis SDS-PAGE de los extractos de vaina de frijol precipitados con sulfato de amonio. El gel se tiñó con Coomassie coloidal. DDF: Días después de la floración.

Posteriormente, las fracciones obtenidas fueron usadas para un ensayo de inmunodetección. El resultado se presenta en la Figura 19.

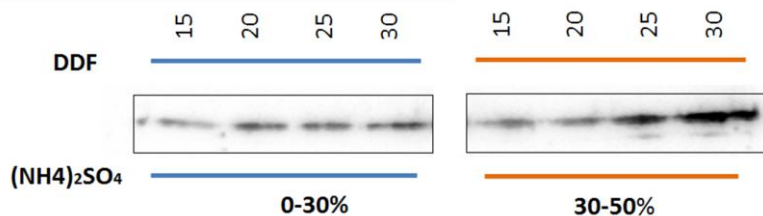


Fig. 19. Inmunodetección de la enzima DPE2 en extractos de vaina precipitados con las concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que se indican.

Allí puede observarse que en los extractos de 20 DDF, una parte importante de la proteína reconocida por los anticuerpos se encuentra en la fracción que precipita con 30% de sulfato de amonio; mientras que en los extractos de 25 y 30 DDF, la mayor parte de la proteína se recuperó en la fracción que precipita con 30-50 % de sulfato de amonio.

8.2.3 Discusión

El análisis bioinformático muestra que el gen que codifica para la proteína DPE1 en *Phaseolus vulgaris* (Phvul.009g139500.1) es similar al gen homólogo en *Arabidopsis thaliana* (At5g64860): poseen un tamaño similar (562 y 576 aa, y un peso molecular de 63.22 y 64.42 kDa, respectivamente) y el grado de similitud de la secuencia es muy elevado (alineamiento 1). Esto sugiere que ambas enzimas podrían llevar a cabo una función similar en las dos especies. Por otro lado, en frijol existen dos genes que codifican para la proteína DPE2 (Phvul.001g117500.1 y Phvul.001g117700.1), con secuencias de 338 y 600 aa, y una masa molecular de 38.29 y 69.81 kDa, respectivamente; mientras que en *A. thaliana* el gen At2g40840 codifica para una proteína de 955 aa y un peso molecular de 109.79 kDa. La proteína codificada por el gen Phvul.001g117500.1 es muy similar al extremo amino terminal de la proteína codificada por el gen At2g40840 (alineamiento 2); mientras que la codificada por el gen Phvul.001g117700.1, tiene alta similitud con el extremo carboxilo terminal de la proteína codificada por el gen At2g40840 (alineamiento 3). Estas diferencias sugieren que la funcionalidad de estas proteínas podría ser diferente en ambas especies. Por otro lado, los anticuerpos contra la enzima DPE2 de *Arabidopsis* podrían reconocer a las 2

proteínas que de acuerdo con el análisis bioinformático, estarían presentes en los extractos de las vainas. Sin embargo, solo detectaron 1 banda de 60 kDa (Figura 17). Este resultado indica que es necesario investigar si ambas proteínas son funcionales, y si sus características son similares a las de la enzima de *Arabidopsis*. Por otro lado, la abundancia de la proteína reconocida por los anticuerpos contra DPE2 en extractos de vaina, depende de la edad del fruto (Figura 17), siendo probable que su participación en el metabolismo del almidón está controlada por el desarrollo del fruto. Adicionalmente, se encontró que la precipitación diferencial con sulfato de amonio es una estrategia efectiva para aumentar la concentración de la enzima DPE2 en extractos de vaina, lo que sin duda facilitará la realización de estudios posteriores.

8.2.4 Conclusiones

El análisis de los resultados nos permite llegar a las siguientes conclusiones:

- Usando como referencia las secuencias de *Arabidopsis*, el análisis bioinformático permitió identificar en *Phaseolus vulgaris*, un gen que codifica para la enzima DPE1 (Phvul.009g139500.1) y dos genes que codifican para la enzima DPE2 (Phvul.001g117500.1 y Phvul.001g117700.1).
- La comparación de secuencias de los genes que codifican a la enzima DPE1 en *Arabidopsis* y en frijol; indica que las proteínas resultantes son muy similares y probablemente tengan funciones y propiedades parecidas.
- Los genes de frijol que codifican a la enzima DPE2 son muy diferentes al de *Arabidopsis*, lo que supone diferencias importantes en sus propiedades.
- Los anticuerpos contra la enzima DPE2 de *Arabidopsis* detectaron en extractos de vaina una banda de 60 kDa, cuya abundancia esta regulada por la edad del fruto.
- La enzima DPE2 presente en los extractos de vaina se puede concentrar por precipitación diferencial con sulfato de amonio.

9. REFERENCIAS

- Beebe, S., Rao, I., Mukankusi, C., Buruchara, R. 2013. Improving Resource Use Efficiency and Reducing Risk of Common Bean Production in Africa, Latin America, and the Caribbean. En: C. H. Hershey, P. Neate. eds. Eco-efficiency: From vision to reality. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 117–134.
- Bennett, E. J., Roberts, J. A., Wagstaff, C. 2011. The role of the pod in seed development: strategies for manipulating yield. *New Phytologist*, 190, 838–853.
- Bertoft, E. 2004. Analysing starch structure. En: A. C. Eliasson. ed. Starch in food: Structure, function and applications. CRC Press: Florida. 57-96.
- Bertoft, E., 2015. Fine Structure of Amylopectin. En: Y. Nakamura. ed. Starch: Metabolism and Structure. Japan: Springer, 3-40.
- Blennow, A. 2004. Starch bioengineering. En: A. C. Eliasson ed. Starch in food: Structure, function and applications. CRC Press: Florida. 97-127.
- Blennow, A. 2015. Phosphorylation of the Starch Granule. En: Y. Nakamura. ed. Starch: Metabolism and Structure. Japan: Springer, 399-424.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248–254.
- Bresolin N. S., Li Z., Kosar-Hashemi, B., Tetlow I. J., Chatterjee, M., Rahman, S., Morell, M. K., Howitt, C. A. 2006. Characterisation of disproportionating enzyme from wheat endosperm. *Planta*, 224, 20–31.
- Butler, D.P., van der Maarel, M. J. E. C., Steeneken P. A. M. 2004. Starch-acting enzymes. En: A. C. Eliasson. ed. Starch in food: Structure, function and applications. CRC Press: Florida. 128-155.
- Cakir, B., Tuncel, A., Hwang, S-K, Okita, T. W. 2015. Increase of Grain Yields by Manipulating Starch Biosynthesis. En: Y. Nakamura. ed. Starch: Metabolism and Structure. Japan: Springer, 371-395.
- Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Messerli, G., Chen, J., Zeeman, S.C., Smith, S. M., Smith, A. M. 2004. A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in Arabidopsis leaves at night.

The Plant Journal, 37, 853-863.

- Critchley, J. H., Zeeman, S. C., Takaha, T., Smith, A. M., Smith, S. M. 2001. A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 26(1), 89–100.
- Cuellar-Ortiz, S. M., Arrieta-Montiel, M., Acosta-Gallegos, J., Covarrubias, A. A. 2008. Relationship between carbohydrate partitioning and drought resistance in common bean. *Plant, Cell and Environment*, 31, 1399-1409.
- D’Hulst, C., Wattedled, F., Szydlowski, N. 2015. Starch Biosynthesis in Leaves and Its Regulation. En: Y. Nakamura. ed. *Starch: Metabolism and Structure*. Japan: Springer, 211-237.
- Dong, X., Zhang, D., Liu, J., Liu, Q. Q., Liu, H., Tian, L., Jiang, L., Qu, L. Q. 2015. Plastidial Disproportionating Enzyme Participates in Starch Synthesis in Rice Endosperm by Transferring Maltooligosyl Groups from Amylose and Amylopectin to Amylopectin. *Plant Physiology*, 169, 2496–2512.
- FIRA. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. Banco de México. 2019. *Panorama Agroalimentario. Frijol 2019*. [En línea] (Actualizado a octubre de 2019). Disponible en: <https://www.inforural.com.mx/wp-content/uploads/2020/01/Panorama-Agroalimentario-Frijol-2019.pdf> [Último acceso el 14 de septiembre de 2020].
- Geigenberger, P. 2011. Regulation of Starch Biosynthesis in Response to a Fluctuating Environment. *Plant Physiology*, 155, 1566–1577.
- Kossman, J., Lloyd, J. 2000. Understanding and Influencing Starch Biochemistry. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(3), 171-226.
- Lourdin, D., Putaux, J. L., Potocki-Véronèse, G., Chevigny, C., Rolland-Sabaté, A., Buléon, A. 2015. Crystalline Structure in Starch. En: Y. Nakamura. ed. *Starch: Metabolism and Structure*. Japan: Springer, 61-90.
- Lunn, J. E. y MacRae, E. 2003. New complexities in the synthesis of sucrose. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 208-214.
- MacNeill, G. J., Mehrpouyan, S., Minow, M. A. A., Patterson, J. A., Tetlow, I. J., Emes, M. J. 2017. Starch as a source, starch as a sink: the bifunctional

role of starch in carbon allocation. *Journal of Experimental Botany*, 68(16), 4433–4453.

- Martins Ochubiojo, E., Rodrigues, A. 2012. Starch: From Food to Medicine. En: B. Valdez, M. Schorr, R. Zlatev. eds. Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry. Rijeka: InTech, 355-380.
- Mason, W. R. 2009. Starch Use in Foods. En: J. N. BeMiller, R. L. Whistler eds. Starch: Chemistry and Technology. New York: Academic Press. 745-795.
- Møller, M.S. Svensson, B. 2016. Structural biology of starch-degrading enzymes and their regulation. *Current Opinion in Structural Biology*, 40, 33–42.
- Muntz, K., Schalldach, I., Manteuffel, R. 1976. The function of the pod for protein storage in seeds of *Vicia faba* L. *Biochemistry & Physiology*, 170, 465-477.
- Nakamura, Y. 2015. Biosynthesis of Reserve Starch. En: Y. Nakamura. ed. Starch: Metabolism and Structure. Japan: Springer, 161-209.
- Padilla-Chacón, D., Martínez-Barajas, E., García-Esteva, A., Leal-Delgado, R., Kohashi-Shibata, J., Peña-Valdivia, C. B. 2017. Biomass remobilization in two common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars under water restriction. *South African Journal of Botany*, 112, 79–88.
- Pfister, B., Zeeman S. C. 2016. Formation of starch in plant cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, 2781-2807.
- Preiss, J. 2004. Plant Starch synthesis. En: A. C. Eliasson ed. Starch in food: Structure, function and applications. CRC Press: Florida. 3-56.
- Ragel, P., Streb, S., Feil, R., Sahrawy, M., Annunziata, M. G., Lunn, J. E., Zeeman, S., Mérida, A. 2013. Loss of starch granule initiation has a deleterious on the growth of *Arabidopsis* plants due to an accumulation of ADP- glucose. *Plant Physiology*, 163, 75-85.
- Rendón-Anaya, M. y Herrera-Estrella, A. 2017. Requirement of Whole-Genome Sequencing. En: M. Pérez de la Vega, M. Santalla, F. Marsolais. eds. The Common Bean Genome. Switzerland: Springer. 109-128.

- Roldán, I., Wattebled, F., Mercedes Lucas, M., Delvallé, D., Planchot, V. Jiménez, S., Pérez, R., Ball, S., D'Hulst, C., Mérida, A. 2007. The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *The Plant Journal*, 49, 492-504.
- SAGARPA. 2017. Planeación agrícola nacional 2017-2030. *Frijol Mexicano*. [En línea]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256428/B_sico-Frijol.pdf [Último acceso el 14 de septiembre de 2020].
- Satoh, H., Shibahara, K., Tokunaga, T., Nishi, A., Tasaki, M., Hwang, S. K., Okita, T. W., Kaneko, N., Fujita, N., Yoshida, M., Hosaka, Y., Sato, A., Utsumi, Y., Ohdan, T., Nakamura, Y. 2008. Mutation of the plastidial α -glucan phosphorylase gene in rice affects the synthesis and structure of starch in the endosperm. *The Plant Cell*, 20, 1833-1849.
- Silva-Cristobal, L., Osorio-Díaz, P., Tovar, J., Bello-Pérez, L. A. 2010. Chemical composition, carbohydrate digestibility, and antioxidant capacity of cooked black bean, chickpea, and lentil Mexican varieties. *CyTA – Journal of Food*, 8(1), 7-14.
- Smirnova, J., Fernie, A. R., Steup, M. 2015. Starch Degradation. En: Y. Nakamura. ed. *Starch: Metabolism and Structure*. Japan: Springer, 239-290.
- Smith, A. M., Zeeman, S. C., Smith, S. M. 2005. Starch degradation. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 73–98.
- Smith, A. M. 2012. Starch in the *Arabidopsis* plant. *Starch/Stärke*, 64, 421-434.
- Smith, S. M., Fulton, D. C., Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Dunstan, H., Hylton, C., Zeeman, S. C., Smith, A. M. 2004. Diurnal Changes in the Transcriptome Encoding Enzymes of Starch Metabolism Provide Evidence for Both Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Starch Metabolism in *Arabidopsis* Leaves. *Plant Physiology*, 136, 2687-2699.
- Stitt, M., Zeeman, S.C. 2012. Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 15, 282–292.

- Tamoi, M., Nagaoka, M., Yabuta, Y., Shigeoka, S. 2005. Carbon metabolism in the Calvin cycle. *Plant Biotechnology*, 22, 355–360.
- University of Alberta, Canada. *Sequence Manipulation Suite: Protein Molecular Weight*. [En línea]. Disponible en: https://sites.ualberta.ca/~stothard/javascript/protein_mw.html [Último acceso el 13 de octubre de 2020].
- Wingfield, P. T. 2001. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. *Plant, Cell and Environment*, 31, 1399-1409.
- Zeeman, S.C., Delatte, T., Messerli, G., Umhang, M., Stettler, M., Mettler, T., Streb, S., Reinhold, H., Kötting, O. 2007. Starch breakdown: recent discoveries suggest distinct pathways and novel mechanisms. Review. *Functional Plant Biology*, 34, 465–473

10. BIBLIOGRAFÍA

- Arías, J.H., Rengifo, T., Jaramillo, M. 2007. Manual Técnico: Buenas prácticas agrícolas (BPA) en la producción de frijol voluble. [En línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a1359s/a1359s.pdf> [Último acceso el 28 de julio de 2020].
- Fridlyand, L. E., Scheibe, R. 1999. Regulation of the Calvin cycle for CO₂ fixation as an example for general control mechanisms in metabolic cycles. *Biosystems*, 51, 79-93.
- Smirnova, J., Fernie, A. R., Spahn, C. M. T., Steup, M. 2017. Photometric assay of maltose and maltose-forming enzyme activity by using 4-alpha-glucanotransferase (DPE2) from higher plants. *Analytical Biochemistry*, 532, 72-82.

Alineamiento 2: entre Phvul.001g117500.1 y At2G40840 (*Arabidopsis thaliana*) - DPE2

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

AT2G40840          MNNLGSLSLSTSKSSKPMVSI SFWIPYFTHWGESLLVCGSAPGLGSGNVKGLLLKPSQQ 60
Phvul.001G117500.1  --MVNPGLFSGNKSVMNSVKVSFRIPYFTQWQSLVCGSVPVLGAWNVRGVLVLSVIHQ 57
                   : . . * : : : * * . : * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                   : . . * : : : * * . : * * * * * : * * * * * * * * * * * *

AT2G40840          DDQLIWSGSVSVPPGFSDDYCYVVDSDKSVLRSEFGMKRKLVPETLTGGESVHLRDLW 120
Phvul.001G117500.1  GSELIWGGSTTVPRGFQCQYSYYVDDKKNVLRWETGKKRELIIPQVQSGQEIIVFRDLW 117
                   .. : * * * * * . : * * * * * . : * * * * * . : * * * * * . : * * * * *
                   .. : * * * * * . : * * * * * . : * * * * * . : * * * * * .

AT2G40840          QSGDQALPFRSAFKDVI FHHSFVDVKEKPLGVFMNKSDDQDSDVVVQFKICCPDIGEGTSV 180
Phvul.001G117500.1  QAASDALPFRSAFKDVI FRESWDLSDTTAGVNHINFEPEREAVLVQFKISCPNVEKDSSI 177
                   * : . . : * * * * * * * * * * * . : * * * * * . : * * * * * . : * * * * *
                   * : . . : * * * * * . : * * * * * . : * * * * * . : * * * * *

AT2G40840          YVLGTPEKLGKLVENGLRLNYVDDSIWEADCLIPKADFPKIKYRYCKVQKEDSIGFESGG 240
Phvul.001G117500.1  YVIGSNTKLGQWKAQKGLKLSYFGESVWKAECVMQRSDFLRYRYGKYDRNGKFSIETGS 237
                   * * * * * : * * * * * . : * * * * * . : * * * * * . : * * * * * .
                   * * * * * : * * * * * . : * * * * * . : * * * * * . : * * * * *

AT2G40840          NRELSLHISIGSKQEIYIVMSDGLFRAMPWRGAGVAVPMFVSRSEDDVGVGEFLDLKLLVDW 300
Phvul.001G117500.1  NREVSTNSSTNDVKYIFLSDGMLRET PWRGAGVAIPMFVSRSEDLGVGEFLDLKLLVDW 297
                   * * * * * : * * * * * . : * * * * * . : * * * * * . : * * * * * .
                   * * * * * : * * * * * . : * * * * * . : * * * * * . : * * * * *

AT2G40840          AVDSGLHLVQLLPVNDTSVHKMWWDSPYSSLSVFALHPLYLRVQALSERLPEDIKEEIQ 360
Phvul.001G117500.1  AVASGFHLVQLLPINDTSVHGMWWDSPYRYGGSFKIIVEIR----- 338
                   * * * * * : * * * * * . : * * * * * . : * * * * * . : * * * * * .
                   * * * * * : * * * * * . : * * * * * . : * * * * * . : * * * * *

AT2G40840          KAKNQLDKNDVDYEATMETKLSIAKKIFDIEKDQTLNSSFQKFFSENEGWLKPYAAFCF 420
Phvul.001G117500.1  -----

AT2G40840          LRDFFETS DHSQWGTFSYDITDDKLEKLSKDNLHYNTICFHYIYQYHLHVQLSAAEYAR 480
Phvul.001G117500.1  -----

AT2G40840          KKGVLKGDLPIGVDRNSVDTVVYRNLFMRMTSTGAPPDYFDKNGQNWGFPTYNWEEMSK 540
Phvul.001G117500.1  -----

AT2G40840          DNYAWWRARLTQMGKYFTAYRIDHILGFFRIWELPAHAMTGLVGKFRPSIPLSQEELEKE 600
Phvul.001G117500.1  -----

AT2G40840          GIWDFDRLSKPYIQKFLKFKGDFWPFPIASNFLNETQKDMYEFKEDCNTEKKIVAKLKS 660
Phvul.001G117500.1  -----

AT2G40840          LAEKSLLLENEDKVRDVFDIRNVVLIKDPEDARKFYPRFNIEDTSSFDLDDHSHKSNVL 720
Phvul.001G117500.1  -----

AT2G40840          KRLYDYDFYFQRQEDLWRKNALKTLPALLNNSNMLACGEDLGLIPSCVHPVMQELGLVGLR 780
Phvul.001G117500.1  -----

AT2G40840          IQRMPSESDVKFGIPSNYDYMTVCAPSCHDCSTLRAWWEDEERRQYFKEVIGVDGIPP 840
Phvul.001G117500.1  -----

AT2G40840          SQCIPEITHFILRQHVEAPSMWAI FPLQDMMALKEEYTRPATEETINDPTNPKHYWRYR 900
Phvul.001G117500.1  -----

AT2G40840          VHVTLDSLLKDTDLKSTIKNLVSSSGRSVPANVSGEDINKSRGEVIANGSTKPNP 955
Phvul.001G117500.1  -----

```

CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignments

AT2G40840
Phvul.001G117500.1

Sequence type explicitly set to Protein
Sequence format is Pearson
Sequence 1: AT2G40840 955 aa
Sequence 2: Phvul.001G117500.1 338 aa
Start of Pairwise alignments
Aligning...

Sequences (1:2) Aligned. Score: 53.8462
Guide tree file created: [clustalw.dnd]

There are 1 groups
Start of Multiple Alignment

Aligning...
Group 1: Sequences: 2 Score:2899
Alignment Score 1189

CLUSTAL-Alignment file created [clustalw.aln]

Alineamiento 3: entre Phvu1.001g117700.1 y At2G40840 (*Arabidopsis thaliana*) - DPE2

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

AT2G40840          MMNLGSLSLSTSKSSKPMVSI SFWIPYFTHWGESLLVCGSAPGLGSGNVKKGLLLKPSQQ 60
Phvu1.001G117700.1 -----

AT2G40840          DDQLIWSGSVSVPPGFSSDYCYVVDSDKSVLRSEFGMKRKLVPETLTGGESVHLRDLW 120
Phvu1.001G117700.1 -----

AT2G40840          QSGDQALPFRSAFKDVI FHHSSFDVKVEKPLGVFMNKSDQDDSVVQFKICCPDIGEGTSV 180
Phvu1.001G117700.1 -----

AT2G40840          YVLGTPEKLG NWKVENGLRLNYVDDSIWEADCLIPKADFPIKYRYCKVKEDSIGFESGG 240
Phvu1.001G117700.1 -----

AT2G40840          NRELSLH SIGSKQEYIVMSDGLFRAMPWRGAGVAVPMF SVRSEDDVGVGEFLDLKLLVDW 300
Phvu1.001G117700.1 -----

AT2G40840          AVDSGLHLVQLLPVNDTSVHKMWDSYPYSSLSVFALHPLYLRVQALSERLPEDIKEEIQ 360
Phvu1.001G117700.1 -----

AT2G40840          KAKNQLDKNDVDYEATMETKLSIAKKIFDIEKDQTLNSSTFQKFFSENEGWLKPYAAFCF 420
Phvu1.001G117700.1 -----
                    MATKLSIAKKVFAEEKDLILNSSSFQEFFLENEGWLKPYAAFSF 44
                    * *****:* *** ***.**.* *****.*
                    *

AT2G40840          LRDFFETSDHSQWGTFSDYTDKLEKLSKDNLHYNTICFHYIYQYHLHLVQLSAAEYAR 480
Phvu1.001G117700.1 LRDFFETSDRSQWGRFAHYSDDKLEKLVSKDSLHYEIIICFHYVQYHLHLQLSEAAEYAR 104
                    *****.* ***. *.*.*****.* ***. ***. *****.* ***. *****
                    *

AT2G40840          KKGVVLKGDLP IGVDRNSVDTWVYRNLFRMNTSTGAPPDYFDKNGQNWGFPTYNWEEMSK 540
Phvu1.001G117700.1 KKGVILKGDLP IGVDRNSVDTWVYRNLFRMNTSTGAPPDYFDKNGQNWGFPTYNWEEMSK 164
                    *****.* *****

AT2G40840          DNYAWWRARLTQMKG YFTAYRIDHILGFFRIWELPAHAMTGLVGKFRPSIPLSQEELEKE 600
Phvu1.001G117700.1 DNYGWWRARLTQMAKYFTAYRIDHILGFFRIWELPDHAATGLVGKFRPSIPLSQEELERE 224
                    ***.*****.***** ***** ** *****

AT2G40840          GIWDFDRLSKPYIQK FLEEKFGDFWPF IASNFLNETQKDMYEFKEDCNTEKKIVAKLKS 660
Phvu1.001G117700.1 GIWDFNRLSRPYIKRELLEEKFGAATFVATTFLNELDKNFYEFKEDSNTEKKIASKLKT 284
                    *****.* ***. ***. :.***** *.*.*.*** :.*.*****.*****.* ***.
                    *

AT2G40840          LAEKSLLENEDEKVR RDVFDILRNVLIKDPEDARKFYPRFNIEDTSSSQDLDHHSKNVL 720
Phvu1.001G117700.1 CAGSLLLESEDKLRRNLF DLSQNI VLIIRDPEYPRKFYPRFNLEDTSSSQDLDHHSKNVL 344
                    * .*****.* ***. ***. :.*.***.* ***. *****.* *****

AT2G40840          KRLYDYDFYFQRQED LWRKNALKTLPAL LNSSNMLACGEDLGLIPSCVHPVMQELGLVGLR 780
Phvu1.001G117700.1 KRLYNDYFRCRQENLWSQ NALKTLPVLLNSSDMLACGEDLGLIPSCVHPVMQELGLVGLR 404
                    **** * ** * **.* :*****.***** *****

AT2G40840          IQRMPSESDVKFGI PSNYDYMTVCAPSCHDCSTLRAWWEDEERRQYFKEVIGVDGIPP 840
Phvu1.001G117700.1 IQRMPNEPDLDFGI PSQYSYMTVCAPSCHDCSTLRAWWEDEDRRLRFFKRVVSEDELPP 464
                    *****.*.*. :*****.* ***** ***** ** :.*.*. * :**

AT2G40840          SQCIPEITHFILRQH VEAPSMWAI FPLQDMMALKEEYTRPATEETINDPTNPKHYWRYP 900
Phvu1.001G117700.1 DQCVPEVAHFVLRQHFEAPSMWAI FPLQDLLALKEEYTRPATEETINDPTNPKHYWRYP 524
                    .**.*.*. :.*.*****.***** *****

AT2G40840          VHVTLDSLKLDKTD LKSTIKNLVSSSGRSVPANVSGEDINKSRGEVIANGSTKPNP----- 955
Phvu1.001G117700.1 VHVSLSLIKDIELQTTIKDLVRW SGRSVPKEDSGVDASLVAALSVAEAVSVLSVAEAVS 584
                    ***.*.*.*.* :.*.***.* ***** : ** * . . :*. : .

AT2G40840          -----
Phvu1.001G117700.1 GKQKFSSTTEKPVLVK 600
    
```

CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignments

AT2G40840
Phvul.001G117700.1

Sequence type explicitly set to Protein
Sequence format is Pearson
Sequence 1: AT2G40840 955 aa
Sequence 2: Phvul.001G117700.1 600 aa
Start of Pairwise alignments
Aligning...

Sequences (1:2) Aligned. Score: 75.5
Guide tree file created:

There are 1 groups
Start of Multiple Alignment

Aligning...
Group 1: Sequences: 2 Score:9638
Alignment Score 3010

CLUSTAL-Alignment file created [clustalw.aln]