



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE LA IMPORTANCIA DE LA FOSFORILACIÓN DE
HEXOSAS PARA LA ACUMULACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN
VAINAS DE FRUTOS DE FRIJOL**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

ERWIN ALEJANDRO CARMONA PAREDES



CDMX

2022



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:** Dra. Marina Gavilanes Ruiz
VOCAL: **Profesor:** Dr. J. Eleazar Martínez Barajas
SECRETARIO: **Profesor:** Dra. Carmina Montiel Pacheco
1er. SUPLENTE: **Profesor:** Dra. María Elena Ibarra Rubio
2° SUPLENTE: **Profesor:** Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares

Trabajo realizado en el laboratorio 102 del conjunto E de la Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria, CDMX.

ASESOR DEL TEMA: Dr. J. Eleazar Martínez Barajas

SUPERVISOR TÉCNICO: Dra. Lilia Angélica Bernal Gracida

SUSTENTANTE: Erwin Alejandro Carmona Paredes

Agradecimientos.

Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento otorgado por DGAPA-UNAM (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) y por la Facultad de Química, UNAM (PAIP 5000-9127).

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1 La planta y el fruto de frijol.....	5
2.1.1 Importancia del frijol en México.....	6
2.1.2 Anatomía y desarrollo de la planta.....	8
2.1.3 Variabilidad genética.....	8
2.1.4 La vaina y su importancia para el desarrollo del fruto.....	9
2.2 Metabolismo de azúcares en plantas.....	9
2.2.1 Enzimas que fosforilan a la glucosa y fructosa.....	10
2.2.2 Importancia de las fructocinasas en el desarrollo del fruto.....	11
2.2.3 Relación de los niveles de almidón con las fructocinasas.....	12
3. ANTECEDENTES.....	14
4. HIPÓTESIS.....	16
5. OBJETIVOS.....	16
6. METODOLOGÍA.....	17
6.1 Material biológico.....	17
6.2 Determinación de carbohidratos.....	17
6.2.1 Fructosa, glucosa y sacarosa.....	17
6.2.2 Almidón.....	18

6.3 Cuantificación del flujo de sacarosa que recibe el fruto.....	18
6.4 Medición de la actividad de fructocinasas y glucocinasas.....	19
6.4.1 Preparación de los extractos.....	19
6.4.2 Medición de proteína.....	19
6.4.3 Glucocinasas.....	19
6.4.4 Fructocinasas.....	20
6.4.4.1 Saturación por fructosa.....	20
6.4.4.2 Saturación por ATP.....	20
6.4.5 Determinaciones de los parámetros cinéticos.....	20
6.5 Inmunodetección de las fructocinasas.....	21
7. RESULTADOS.....	23
7.1 Contenido de carbohidratos totales (fructosa, glucosa, sacarosa y almidón).....	23
7.2 Cuantificación de la sacarosa que reciben los frutos.....	24
7.2.1 Correlación entre la sacarosa recibida por los frutos y la cantidad de carbohidratos totales en la vaina.....	25
7.3 Distribución de los carbohidratos presentes en la vaina.....	25
7.4 Actividad enzimática de las glucocinasas (GLKs).....	27
7.5 Actividad enzimática de las fructocinasas (FRKs).....	28
7.5.1 Parámetros cinéticos de la actividad de fructocinasa para el sustrato ATP.....	28
7.5.2 Parámetros cinéticos de la actividad de fructocinasa para el sustrato fructosa.....	31

7.6 Inmunodetección de las fructocinasas.....	32
8. DISCUSIÓN.....	34
9. CONCLUSIONES.....	38
10. PERSPECTIVAS.....	39
11. REFERENCIAS.....	40

1. RESUMEN

Las vainas de los frutos de frijol tienen un papel muy importante en el desarrollo de las semillas. Su metabolismo se caracteriza por acumular una cantidad importante de almidón que se degrada cuando las semillas entran en la etapa de crecimiento acelerado. La etapa de síntesis de almidón también se distingue por la elevada cantidad de fructosa, lo que sugiere que su fosforilación podría ser un factor limitante de la síntesis de almidón. En este trabajo analizamos 6 genotipos y encontramos que la cantidad de carbohidratos presentes en la vaina no siempre está relacionada con el suministro de sacarosa al fruto. El análisis de la actividad y cantidad de fructocinasa mostró propiedades que sugieren que esta enzima tiene un papel importante en el metabolismo de carbohidratos en la vaina. Sin embargo, la importancia de su participación podría ser dependiente del genotipo.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 La planta y el fruto de frijol

El nombre científico del frijol es *Phaseolus vulgaris* y es la especie cultivada más importante del género *Phaseolus* que pertenece a la familia de las fabáceas (*Fabaceae*), también conocidas como leguminosas. El frijol es una de las leguminosas más importantes para el consumo humano. A nivel mundial, la superficie cosechada se estima en 36 millones de hectáreas, observándose una tendencia a incrementar tanto la superficie cosechada como la producción. Este cultivo es importante en sistemas, regiones y ambientes tan diversos como los que hay en América Latina, África, el Medio Oriente y Europa, siendo un alimento tradicional y básico en Brasil, México, América Central y el Caribe (CEDRSSA, 2020).

El cultivo de frijol se puede realizar bajo casi todas las condiciones de suelo y clima; es importante en las 32 entidades federativas del país, sin embargo, tres cuartas partes de la producción nacional se concentran en los estados de Zacatecas, Sinaloa, Durango, Chihuahua, Chiapas, Nayarit, Guanajuato y San Luis Potosí. La producción nacional de frijol en 2021 se estima que fue de un millón 177 mil toneladas, lo que representa un aumento de 11.4% con respecto a la cosecha de 2020 (SADER, 2022).

Como la mayoría de las leguminosas, el frijol tiene un alto contenido de proteína (14 a 33%), almidón, vitaminas del complejo B, minerales (Ca, Cu, K, Mg, P, y Zn) y fibra alimentaria (15.5 a 21.0 g por cada 100 g de grano cocinado). Sus proteínas son deficientes en aminoácidos azufrados y en triptófano, pero contiene cantidades suficientes de lisina (1.2 a 1.5 g por 100 g de grano) que es un aminoácido esencial, lo que significa que el organismo humano no la produce por sí mismo, sino que tiene que ser ingerido externamente a través de la alimentación. Por otro lado, la ingesta regular de frijol favorece en la disminución de los niveles de colesterol y reduce los riesgos de padecer cáncer (Peña-Valdivia *et al.*, 2011; Celis-Velázquez *et al.*, 2010).

2.1.1 Importancia del frijol en México

El frijol es un alimento base en México que se utiliza para preparar innumerables platillos, es la leguminosa más consumida en el país y representa el 36% de la ingesta diaria de proteínas (Lara, 2015). El consumo anual per cápita es de 9.9 kg y la producción nacional cubre casi la totalidad de los requerimientos de consumo de los mexicanos. Durante 2016 las 1.08 millones de toneladas generadas cubrieron 89.24% del consumo nacional (SAGARPA, 2017).

Del frijol se consumen todas sus partes, sus flores, semillas y vainas; ya sean tiernas o maduras; en algunas zonas de México, las semillas se sacan de la vaina y se muelen utilizándolas como ingredientes en la preparación de algunos tamales. Por la variedad de platillos que se pueden preparar usando diferentes partes de la planta, se le considera una “planta integral” (SADER, 2019).

El frijol es parte fundamental de la dieta del mexicano, por lo que el artículo 179 de la Ley de Desarrollo Rural Sustentable (LDRS) lo considera un producto básico y estratégico para el país. De acuerdo con datos de la FAO, en 2019 México fue el noveno productor mundial de frijol con un total de 879,404 toneladas al año. Esto representa alrededor del 3% de la producción mundial.

2.1.2 Anatomía y desarrollo de la planta

La planta de frijol está conformada por raíz, tallo, hojas, flores, fruto y semillas (Figura 1). Es una planta herbácea de tallos delgados y débiles, cuadrangulares, a veces rayados de púrpura, hojas trifoliadas y ápice acuminado.

Los frutos están unidos a la planta por una estructura llamada pedúnculo, a través del cual le llegan los nutrientes (Figura 2). El fruto está formado por una vaina de 8 a 20 centímetros de largo de color verde, amarillo, púrpura o negro, que alberga en su interior hasta 12 semillas en forma de riñón de unos 0.5 a 2.0 centímetros de longitud y de color variado (SAGARPA, 2017).

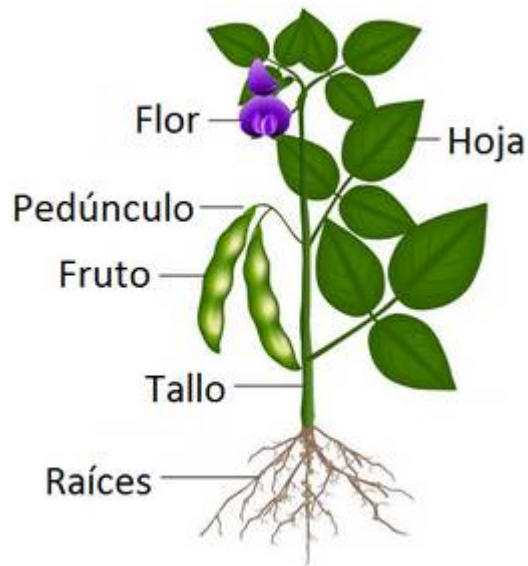


Figura 1. Esquema de la planta de frijol después de que ha ocurrido la floración. Las semillas se encuentran dentro del fruto cubiertas por la vaina (Imagen obtenida de: <https://sp.depositphotos.com/>)

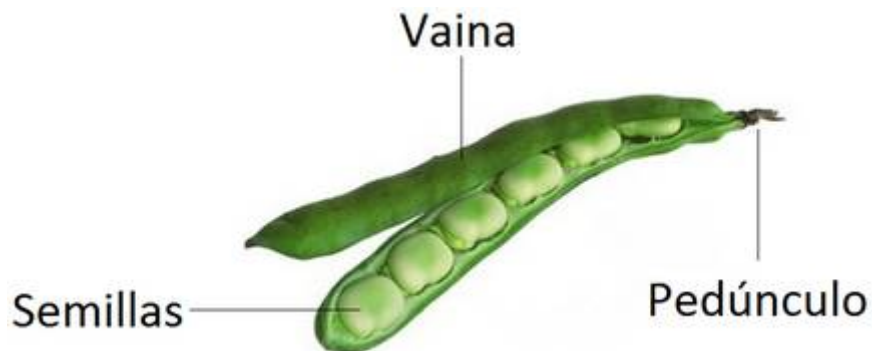


Figura 2. Estructura del fruto de frijol. El pedúnculo es la estructura por donde el frijol se une a la planta. Los frutos son de color variable (verde, rojo, y verde o amarillo jaspeado de marrón) y en su interior se pueden encontrar hasta 12 semillas.

El desarrollo de la planta de frijol comprende dos fases sucesivas: la vegetativa y la reproductiva (Figura 3). La fase vegetativa se inicia en el momento en que la semilla dispone de condiciones favorables para germinar, y termina cuando aparecen los primeros botones florales. La fase reproductiva se inicia con la aparición de los primeros botones o racimos florales y termina cuando el grano alcanza el grado de madurez necesario para la cosecha (Fernández *et al.*, 1986). A lo largo de las fases

vegetativa y reproductiva se han definido las 10 etapas que conforman la escala que se muestra en la Figura 3.

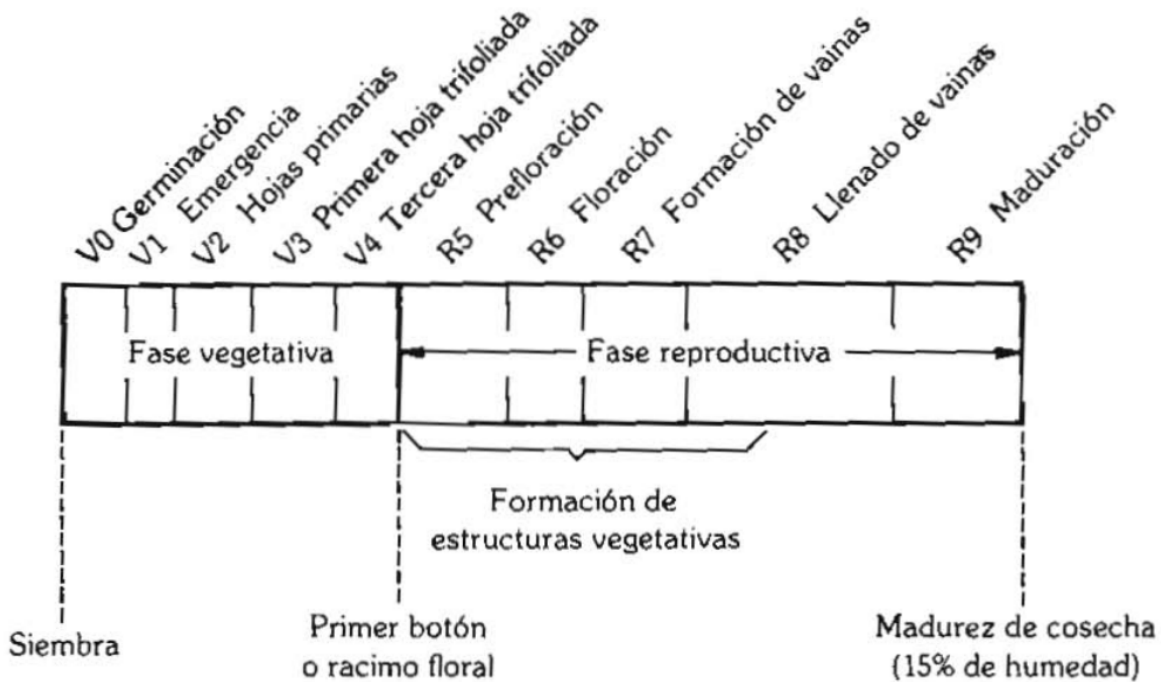


Figura 3. Etapas de desarrollo de la planta de frijol. Las etapas se designan con un código formado por una letra y una cifra; la letra, V o R, es la inicial de la fase (vegetativa o reproductiva) a la cual pertenece la etapa, mientras la cifra (0 a 9) indica la posición de la etapa dentro del ciclo de vida de la planta (Fernández *et al.*, 1986).

Se cultiva como monocultivo, en asociación con otros cultivos o como parte de una rotación de cultivos con la que se busca mejorar las características de los suelos. Sin embargo, su adaptación a diversos ambientes, con frecuencia se refleja en su morfología y en la velocidad de su crecimiento y desarrollo. En este sentido, se ha reportado que la sucesión y duración de las diferentes etapas de desarrollo son afectadas por la temperatura, la humedad, la intensidad de la luz y el fotoperiodo (Treviño y Rosas 2013).

2.1.3 Variabilidad genética

Actualmente se conocen más de 150 variedades de frijoles, de las cuales una tercera parte se encuentran en México (SADER, 2019).

Esta enorme variabilidad genética que se ve reflejada en las características morfológicas de las semillas y frutos, también pudiera indicar diferencias metabólicas dependientes del genotipo. A manera de ejemplo de esto último, puede mencionarse que la cantidad de carbohidratos que almacenan las vainas del fruto de frijol y la manera en que estas los distribuyen hacia las semillas es dependiente del genotipo (Rodríguez, 2019).

2.1.4 La vaina y su importancia para el desarrollo del fruto

La vaina es el tejido dentro del cual se encuentran las semillas; sus principales funciones son protegerlas y regular el flujo y la distribución de la sacarosa, que constituye la manera en que las hojas (en especial las más cercanas al fruto) exportan hacia al fruto los productos de la fotosíntesis (Granot *et al.*, 2013).

Previamente se demostró que las vainas de frutos de frijol acumulan cantidades importantes de carbohidratos (almidón, glucosa, fructosa y sacarosa) que son utilizados para el desarrollo de las semillas y cuya importancia se incrementa en condiciones de estrés (Cuellar-Ortiz *et al.*, 2008; Coello *et al.*, 2016; Rodríguez, 2019). La pared de la vaina también es fotosintéticamente activa y contribuye con asimilados y nutrientes que impulsan el crecimiento de la semilla; sin embargo, la síntesis de almidón en la vaina de fruto de frijol depende en gran medida de la actividad fotosintética de las hojas (Belmont *et al.*, 2022).

2.2 Metabolismo de azúcares en plantas

Los cloroplastos de los tejidos fotosintéticos toman el CO₂ presente en la atmósfera y por medio de las reacciones del ciclo de Calvin, lo transforman en azúcares que se usan para la síntesis de almidón o que en forma de gliceraldehído-3-fosfato (GAP) se transporta al citosol, donde se emplea para la síntesis de la sacarosa que se transporta por el tejido conductor (el floema) hacia los órganos o tejidos no fotosintéticos como los tallos o ramas, las raíces, las flores y los frutos que la usan como fuente de energía (Huber, 1989; McCormick *et al.*, 2009; Stein y Granot, 2018; Stirbet *et al.*, 2020).

2.2.1 Enzimas que fosforilan a la glucosa y fructosa

Cuando la sacarosa llega a las células de los órganos no fotosintéticos es hidrolizada; esta acción la pueden realizar las enzimas invertasa y sacarosa sintasa (Granot *et al.*, 2014). Cuando la hidrólisis la realiza la invertasa, los productos son glucosa y fructosa; si la hidrólisis la realiza la sacarosa sintasa, los productos son fructosa y UDP-glucosa (Figura 4). La UDP-glucosa se puede integrar a los procesos metabólicos (Figura 4), sin embargo, para que la fructosa y la glucosa lo hagan necesitan ser fosforiladas.

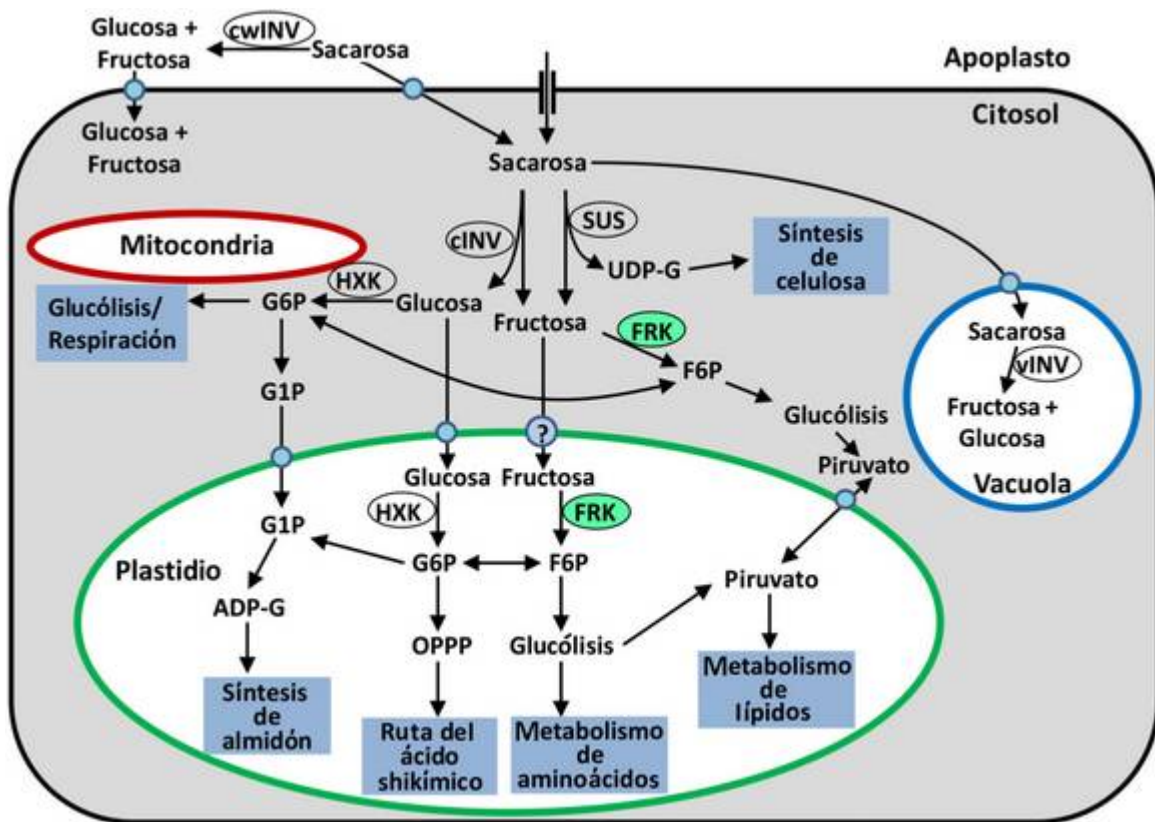


Figura 4. Esquema simplificado del metabolismo de los azúcares en las células no fotosintéticas. UDP-glucosa, fructosa-6-fosfato y glucosa-6-fosfato ya pueden integrarse a los diferentes procesos metabólicos de las células (marcados en azul). ADP-G, ADP-glucosa; cINV, invertasa citosólica; cwINV, invertasa de pared celular; F6P, fructosa-6-fosfato; FRK, fructocinasa; G1P, glucosa-1-fosfato; G6P, glucosa-6-fosfato; HXK, hexocinasa; OPPP, vía oxidativa de las pentosas fosfato; SUS, sacarosa sintasa; vINV, invertasa vacuolar (Stein y Granot, 2018).

En plantas se han encontrado dos clases de enzimas responsables de la fosforilación de hexosas; las hexocinasas (HXK) y las fructocinasas (FRK) (Granot, 2007). Las HXKs fosforilan la glucosa y la fructosa, sin embargo, su afinidad por la glucosa está en el rango de 0.02 a 0.1 mM, mientras que su afinidad por la fructosa es de 2 a 120 mM (Granot, 2007).

Las FRKs fosforilan solo la fructosa (German *et al.*, 2004), su afinidad por la fructosa es mayor en dos órdenes de magnitud que la afinidad de la HXK por la fructosa (Granot *et al.*, 2013) y dentro del mismo rango que la afinidad de la HXK por la glucosa (Pego y Smeekens, 2000; Granot, 2007).

De allí que se haya sugerido que *in vivo* las HXKs probablemente fosforilan la mayor parte de la glucosa, mientras que la fructosa es fosforilada principalmente por las FRKs.

La mayoría de las especies tienen una HXK y una FRK plastídicas, y múltiples isoenzimas en el citoplasma. Sin embargo, mientras que las FRKs citoplasmáticas se encuentran en el citosol, las HXKs citoplasmáticas con frecuencia se reportan asociadas con las mitocondrias (Granot *et al.*, 2013).

2.2.2 Importancia de las fructocinasas en el desarrollo del fruto

Las FRKs juegan un papel fundamental para el desarrollo de la planta. La supresión antisentido de los genes que codifican a las isoformas citosólicas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), *LeFRK1* y *LeFRK2*, afectó negativamente el desarrollo de las plantas, inhibió el desarrollo vascular y de la pared celular, al mismo tiempo que provocó la acumulación de fructosa y sacarosa (Odanaka *et al.*, 2002; German *et al.*, 2004).

Por otra parte, la sobreexpresión del gen de tomate *FRK1* en plantas de algodón aumentó la actividad de FRK en hojas y fibras. Las plantas transformadas tenían mayor área foliar, el diámetro de tallo era más grande y el nivel de sacarosa en las hojas era más bajo. Estos cambios contribuyeron a incrementar el número de frutos y de semillas, así como el rendimiento de la fibra (Mukherjee *et al.*, 2015).

2.2.3 Relación de los niveles de almidón con las fructocinasas

La ruta postulada para la biosíntesis de almidón involucra principalmente tres enzimas (Figura 5): la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), las sintetasas de almidón (SS) y la enzima ramificadora del almidón (SBE). La síntesis de almidón comienza con una molécula de glucosa-1-fosfato la cual por acción de la enzima AGPasa se convierte en ADP-glucosa que actúa como donante de glucosilo para diferentes clases de SS, que alargan las cadenas de glucano α -1,4 de los dos polímeros amilosa y amilopectina, que componen el gránulo del almidón. La amilosa es un glucano esencialmente lineal que contiene muy pocas ramificaciones α -1,6 y constituye de un 20 % a 30 % del almidón, mientras que la amilopectina es más ramificada. Los puntos de ramificación son introducidos por dos clases de enzimas ramificadoras (SBE). Curiosamente, la síntesis de almidón también implica la participación de dos tipos de enzimas desramificadoras que escinden los puntos de ramificación. Su actividad es necesaria para que los glucanos ramificados puedan participar en la formación de la estructura cristalina de los gránulos (Geigenberger, 2011).

Debido a que la glucosa-6-fosfato y la fructosa-6-fosfato pueden ser usadas en la síntesis de almidón, es posible que las actividades de fructocinasas y glucocinasas influyan en los niveles de almidón en la planta. Los resultados del análisis de la relación entre la acumulación de almidón y la actividad de FRKs en frutos de tomate (Schaffer y Petreikov, 1997), apoyan esta sugerencia.

3. ANTECEDENTES

En estudios previos se observó que los niveles de carbohidratos en las vainas de frutos de frijol cambian en función del crecimiento de las semillas (Belmont *et al.*, 2022).

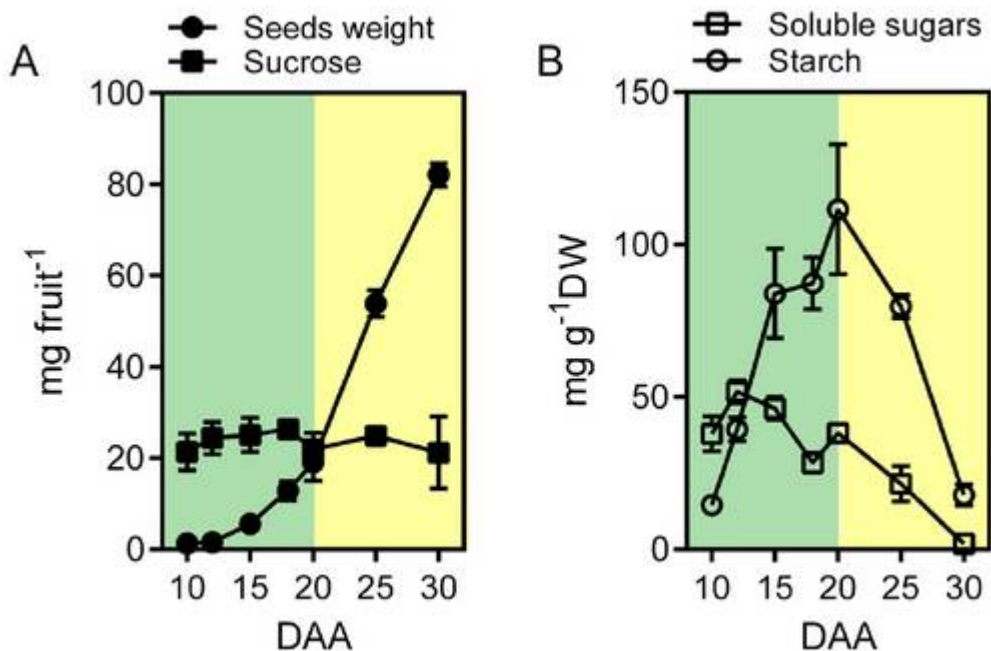


Figura 6. Cambios en el peso de las semillas y la cantidad de carbohidratos presentes en la vaina durante el desarrollo del fruto. A: Incremento en peso seco de semilla y sacarosa descargada al fruto durante un periodo de 24 h. B: Almidón y azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) presentes en la vaina durante el desarrollo del fruto. DDA: días después de la floración (Belmont *et al.*, 2022).

Como se puede ver en la Figura 6, la cantidad de sacarosa que reciben los frutos se mantiene casi constante a lo largo del desarrollo de las semillas. En una primera etapa, la velocidad de crecimiento de las semillas es baja y después del día 20 DDA se incrementa de manera exponencial. Por otro lado, la cantidad de azúcares solubles en la vaina se incrementa un poco en los primeros días y después disminuye gradualmente a lo largo del desarrollo.

Estos datos sugieren que, en la primera etapa, la cantidad de sacarosa que recibe el fruto es mayor a la que las semillas necesitan para desarrollarse, y que el excedente se almacena en forma almidón, que se degrada en la segunda etapa cuando la demanda de carbono de las semillas es mayor. Si esto es así, el

metabolismo de carbono en la vaina de los frutos de frijol está asociado al desarrollo de las semillas y podría influir en la productividad del cultivo. Por otro lado, en estudios anteriores hemos observado que hay grandes diferencias entre genotipos en la cantidad de almidón y azúcares solubles que acumulan en la vaina de sus frutos. Un hecho que resalta, es que la cantidad de fructosa es generalmente superior a la de glucosa; por lo que en este trabajo se decidió aprovechar la variabilidad genética disponible para investigar el grado de correlación entre la actividad de las enzimas responsables de la fosforilación de hexosas con los niveles de hexosas y almidón acumulados en la vaina. El estudio se hizo en frutos de 15 días después de la antesis (DAA) ya que en este momento aún está ocurriendo síntesis de almidón (Figura 6) lo que posibilita observar la participación de factores que estén relacionados con este proceso.

4. HIPÓTESIS

La actividad de las enzimas responsables de la fosforilación de fructosa y glucosa, se correlaciona directamente con los niveles de sacarosa, glucosa, fructosa y almidón almacenados en la vaina de los frutos de frijol.

5. OBJETIVOS

En frutos de 6 genotipos de frijol:

1. Cuantificar el contenido de sacarosa, glucosa, fructosa y almidón en las vainas.
2. Cuantificar el flujo de la sacarosa que reciben los frutos.
3. Evaluar la actividad enzimática de las fructocinasas y glucocinasas presentes en las vainas.
4. Evaluar mediante ensayos de inmunodetección la cantidad de fructocinasas presentes en las vainas.
5. Analizar si la cantidad y actividad de fructocinasas y glucocinasas están correlacionadas con la cantidad de los carbohidratos almacenados en la vaina.

6. METODOLOGÍA

6.1 Material biológico

Se trabajó con seis genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*): G92, canario 60, cacahuate, G15, G32 y G122. Las semillas se desinfectaron con una solución de etanol al 70% durante un minuto y con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 12 minutos. Se germinaron a temperatura ambiente (23-25°C) en un papel saturado con agua. Las plántulas se sembraron en macetas con agrolita y se regaron de manera alternada con agua y con solución nutritiva Hoagland (Jones, 1982). Las plantas se cultivaron en invernadero con luz natural y una temperatura promedio de 28°C durante el día y 15°C durante la noche.

Los frutos se recolectaron 15 días después de la antesis (DDA), se separaron las semillas, y las vainas se cortaron en pequeños trozos que después de congelarlos en nitrógeno líquido se almacenaron a -70°C.

6.2 Determinación de carbohidratos

Para estas determinaciones se tomó como referencia el método reportado por Bernal *et al.*, 2005 y que a continuación se describe brevemente.

6.2.1 Fructosa, glucosa y sacarosa

Aproximadamente 100 mg de vaina se molieron en 1 mL de una solución de etanol al 80% v/v, la suspensión se puso en un tubo Eppendorf y se calentó a 80°C por 15 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10,000 x *g* por dos minutos y el sobrenadante se usó para la determinación de los carbohidratos solubles y el precipitado para la cuantificación de almidón. Al sobrenadante se le agregó carbón activado (aproximadamente 25 mg) para quitar los compuestos coloridos que interfieren con el análisis.

La mezcla de reacción para la medición de azúcares solubles consistió en Hepes 30 mM pH 7.5, KCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, ATP 1mM, NAD⁺ 1 mM y hexocinasa 5 U/mL. También se prepararon soluciones de las enzimas glucosa-6-fosfato

deshidrogenasa 0.1 U/ μ L, fosfoglucosa isomerasa 0.1 U/ μ L e invertasa 0.05 U/ μ L; todas ellas en una solución de Hepes 0.1 M pH 7.5. Todas estas enzimas de la marca SIGMA y se utilizaron con el fin de convertir a todas las hexosas en la muestra en glucosa-6-fosfato, que después reacciona con NAD⁺ produciendo NADH.

La determinación se realizó en el equipo Thermo Scientific Multiskan FC utilizando una placa de 96 pozos, a cada uno se le agregaron 150 μ L de la mezcla de reacción y 10 μ L de extracto etanólico. Se midió la absorbencia a 340 nm y se registró esta primera lectura, se agregaron 10 μ L de la solución de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, se incubó 10 minutos a 25°C y se tomó segunda lectura a 340 nm; se agregaron 10 μ L de la solución de fosfoglucosa isomerasa, se incubó 10 minutos a 25°C y se midió la absorbencia a 340 nm; finalmente se agregaron 10 μ L de la solución de invertasa y se registró la lectura a 340 nm, longitud de onda a la cual se puede medir el NADH formado por acción de las enzimas.

La diferencia entre las lecturas se utilizó para calcular la concentración de azúcares. Entre la primera y la segunda para la glucosa, entre la segunda y la tercera para la fructosa y entre la tercera y la cuarta para la sacarosa.

Paralelamente se realizaron curvas patrón para cada carbohidrato; las curvas de glucosa y fructosa mostraron una respuesta lineal en un rango de 0 a 5 mM; para la curva patrón de sacarosa, el rango de linealidad fue de 0 a 2.5 mM. Para calcular las concentraciones de carbohidratos los datos de absorbencia obtenidos se interpolaron en la curva patrón correspondiente.

6.2.2 Almidón

El material insoluble en etanol al 80% se resuspendió en 250 μ L de agua, se gelatinizó a 85°C durante 4 h y se hidrolizó con 250 μ L de una mezcla de reacción que contenía acetato de sodio 0.1 M pH 4.5, 220 U de α -amilasa (EC 3.2.1.1) y 220 U de amiloglucosidasa (EC 3.2.1.3), incubando a 37°C toda la noche. El material se aforó a 1 mL y se cuantificó la glucosa en el sobrenadante.

6.3 Cuantificación del flujo de sacarosa que recibe el fruto

Se seleccionaron 10 frutos de cada genotipo que tenían 15 días DDA. Se cortaron en la región del pedúnculo y este se introdujo en un tubo Eppendorf que contenía una solución de EDTA 20 mM pH 7 para evitar la cicatrización del tejido (Araki *et al.*, 1997). Después de dos horas se colectaron los tubos. Para la cuantificación de sacarosa se siguió el procedimiento descrito en la sección 6.2.1.

6.4 Medición de la actividad de fructocinasas y glucocinasas

La actividad de fosforilación de hexosas se midió de acuerdo con los métodos reportados por Schaffer y Petreikov (1997) y Riggs *et al.*, (2017).

6.4.1 Preparación de los extractos

El tejido se pulverizó en un mortero al que se le adicionó nitrógeno líquido. Se homogenizó con dos volúmenes de solución amortiguadora de extracción que contenía 100 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 % de glicerol, 1X mezcla de inhibidores de proteasas (SIGMA P9599) y 0.25% Tritón X-100. Los extractos se centrifugaron a 12,000 x g por 15 minutos y los sobrenadantes se dializaron durante toda la noche a 4°C contra el amortiguador de extracción. Las membranas usadas tenían un rango de exclusión de 5 kDa, lo que permitió eliminar la fructosa.

6.4.2 Medición de proteína

La concentración de proteína se determinó siguiendo el método de Bradford (1976) usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

6.4.3 Glucocinasas

El ensayo se realizó en un medio que tenía la siguiente composición: HEPES 30 mM pH 7.5, KCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, EDTA 0.6 mM ATP 1mM, NAD⁺ 1 mM, glucosa 5 mM y 1.5 U/ensayo de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

La determinación se realizó por quintuplicado en el equipo Thermo Scientific Multiskan FC utilizando una placa de 96 pozos, a cada uno se le agregaron 150 μL de la mezcla de reacción y 50 μL de extracto. El ensayo duró 10 minutos a 25°C; se tomaron lecturas de la absorbencia a 340 nm cada 30 segundos.

6.4.4 Fructocinasas

6.4.4.1 Saturación por fructosa

El ensayo se realizó en un medio que tenía la siguiente composición: Hepes 100 mM pH 7.5, KCl 10 mM, MgCl_2 1 mM, EDTA 0.6 mM, ATP 1 mM, NAD^+ 1 mM, 2 U/ensayo de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 2 U/ensayo de fosfoglucoisomerasa. Se complementó agregando la cantidad necesaria de fructosa para que su concentración en el ensayo fuera 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.5, 2, y 3 mM.

La determinación de la actividad se hizo por quintuplicado en el equipo Thermo Scientific Multiskan FC utilizando una placa de 96 pozos, a cada uno se le agregaron 140 μL de la mezcla de reacción y 10 μL de la solución de fructosa correspondiente, se incubó 10 minutos a 25°C. Después se agregaron 50 μL de extracto y el ensayo se realizó durante 15 minutos a 25°C. Se realizaron mediciones de la absorbencia a 340 nm cada 30 segundos.

6.4.4.2 Saturación por ATP

En este caso, el ensayo incluyó 0.2 mM de fructosa y se complementó con la cantidad necesaria para obtener las siguientes concentraciones finales 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 1 y 2 mM.

Después se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior.

6.4.5 Determinaciones de los parámetros cinéticos

Se realizó una regresión lineal con los datos de absorbencia obtenidos con las diferentes concentraciones de los sustratos. El valor de la pendiente (cambio de la absorbencia por segundo) se multiplicó por el coeficiente de extinción molar de

NADH; el valor resultante fue dividido por la cantidad de proteína presente en los ensayos, lo que permitió expresar la actividad en $\mu\text{mol NADH}/\text{min}/\text{mg}$. Estos valores de actividad se introdujeron en el programa GraphPad Prism el cual permitió obtener las gráficas de actividad.

En el caso de las fructocinasas cuando la fructosa fue el sustrato variable, se utilizó la ecuación que describe una inhibición parcial por sustrato (1). Mientras que, cuando ATP fue el sustrato variable se utilizó la ecuación de Michaelis-Menten (2).

$$(1) \quad v_0 = [S] (V_{\text{max}} + V_{\text{max}_{\text{inh}}} [S] / K_i) / \{K_m + [S] (1 + [S] / K_i)\}$$

$$(2) \quad v_0 = V_{\text{max}} [S] / K_m + [S]$$

Donde v_0 corresponde a la velocidad inicial de la reacción, V_{max} es la velocidad máxima, $V_{\text{max}_{\text{inh}}}$ es la velocidad máxima cuando hay inhibición por altas concentraciones de sustrato y la actividad ya no se modifica, $[S]$ es la concentración de sustrato, K_i es la constante de inhibición, y K_m es la constante de Michaelis-Menten. Utilizando estas ecuaciones en el programa se pudieron obtener los parámetros cinéticos K_m , K_i , V_{max} .

6.5 Inmunodetección de las fructocinasas

Se utilizaron los extractos descritos en el apartado 6.4.1 para realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Se utilizaron geles al 10% en condiciones desnaturizantes de acuerdo con el procedimiento descrito por Laemmli (1970).

La preparación del gel se hizo de la siguiente manera:

Tabla 1. Composición de las soluciones utilizadas para el SDS-PAGE.

Solución	Composición
Solución de acrilamida	30% m/v de acrilamida 0.8% m/v de bisacrilamida
Persulfato de amonio	10% p/v
Amortiguador gel separador (8x)	Tris-HCl 3 M (pH 8.8)

Amortiguador gel apilador (4x)	Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8)
Dodecilsulfato de sodio (SDS)	20% p/v
Amortiguador de corrida	Tris 25 mM Glicina 0.192 M SDS 0.1% m/v
Amortiguador de muestra (2x)	Tris 0.12 M SDS 4% m/v 2-mercaptoetanol 10% Glicerol 20% v/v Azul de bromofenol 2 mg/mL
Solución de tinción	Azul de Coomassie G-250 0.02% p/v Sulfato de aluminio 5% p/v Etanol 10% v/v Ácido ortofosfórico 2% v/v

Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF. La solución de transferencia fue preparada con Tris 25 mM pH 8.3, glicina 190 mM y metanol 20%. La transferencia se llevó a cabo a 100 V por una hora.

La membrana se incubó una hora con agitación suave en una solución de leche descremada al 5% disuelta en TBST (Tris-base 40 mM pH 7.6, 275 mM NaCl y Tween-20 0.2%). Después, se agregó el anticuerpo primario diluido 1:20,000 y se incubó toda la noche a 4°C con agitación suave. Al día siguiente, se removió la solución con el anticuerpo primario y se hicieron tres lavados de 15 minutos cada uno con TBST. Después, la membrana se incubó por una hora en una solución con un anticuerpo secundario al que se le ha acoplado una enzima de la marca SIGMA con actividad de peroxidasa diluido 1:30,000 en TBST. El anticuerpo primario estaba dirigido contra la FRK y fue purificada de frutos de jitomate que fue inyectada a conejos; mientras que el anticuerpo secundario, estaba dirigido contra la subunidad grande de Rubisco y se hizo inyectando la proteína purificada de hojas de espinaca en conejos.

Pasado ese tiempo, la membrana se cubrió con el sustrato (Chemiluminescent HRP substrate) que la actividad de peroxidasa convierte en una señal luminosa detectada en el equipo ChemiDoc (BioRad). Las imágenes de la señal luminosa emitida por la membrana, como las fotografías de los geles teñidos con azul de Coomassie fueron procesadas con el programa Image Lab (BioRad).

7. RESULTADOS

7.1 Contenido de carbohidratos totales (fructosa, glucosa, sacarosa y almidón)

En la Figura 7 se muestran los promedios de las determinaciones del contenido total de carbohidratos en vainas de frutos de 15 DDA. El ANOVA de los resultados señaló la existencia de diferencias significativas entre genotipos. Para averiguar cuáles eran los genotipos diferentes, se realizó una prueba de Tukey con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$.

En la Figura 7 se aprecia que las vainas del genotipo G92 tienen la cantidad más elevada, si bien G15 y G32 mostraron cantidades semejantes estadísticamente y la más baja se encontró en canario 60 y también en cacahuate, G122 tuvo un valor intermedio entre los extremos definidos por los genotipos G92 y canario 60.

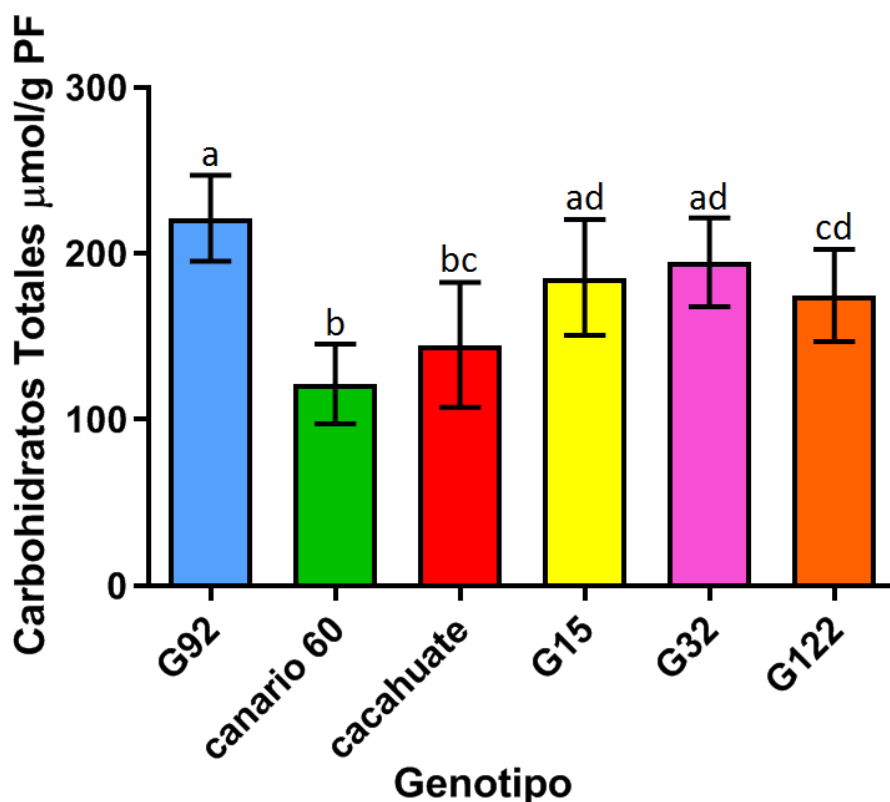


Figura 7. Cantidad de carbohidratos totales (fructosa, glucosa, sacarosa y almidón) en las vainas de frutos de frijol a los 15 DDA de los genotipos G92, canario 60, cacahuate, G15, G32 y G122. Las barras representan el valor de la media \pm DE. Las barras con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). $n=10$ muestras para G92, canario 60, cacahuate, G15 y G32. $n=8$ muestras para G122. DE: desviación estándar.

7.2 Cuantificación de la sacarosa recibida por los frutos

La cantidad de sacarosa que los frutos reciben puede ser un factor que influya en el contenido de carbohidratos que se almacenan en la vaina, por ello, se midió la cantidad de sacarosa que reciben los frutos por hora. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8. El ANOVA de los promedios arrojó que sí había diferencia significativa entre genotipos. Para averiguar cuáles eran los genotipos diferentes, se realizó una prueba de Tukey con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$.

De acuerdo con este análisis, el genotipo G92 recibe la menor cantidad de sacarosa, mientras que G32 es el genotipo al que le llegan los valores más altos (Figura 8).

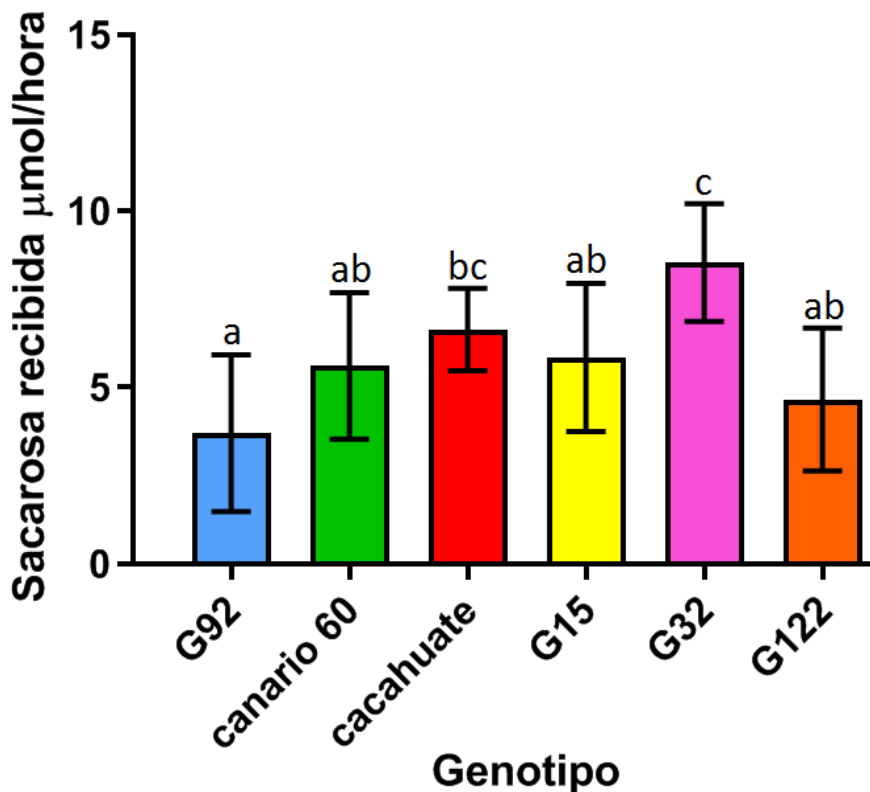


Figura 8. Cantidad de sacarosa recibida por los frutos de frijol a los 15 DDA de los genotipos G92, canario 60, cacahuete, G15, G32 y G122. Las barras representan el valor de la media \pm DE. Las barras con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). $n=10$ muestras para G92, canario 60, cacahuete, G32 y G122. $n=9$ muestras para G15. DE: desviación estándar.

7.2.1 Correlación entre la sacarosa recibida por los frutos y la cantidad de carbohidratos totales en la vaina

En un siguiente paso, la cantidad de carbohidratos totales en las vainas se graficó como función de la cantidad de sacarosa recibida por los frutos (Figura 9). Como puede apreciarse, no hay una buena correlación entre ambas variables. Sin embargo, llama la atención que el genotipo que recibe menos sacarosa (G92), es el que acumula los niveles de carbohidratos más altos en las vainas de sus frutos.

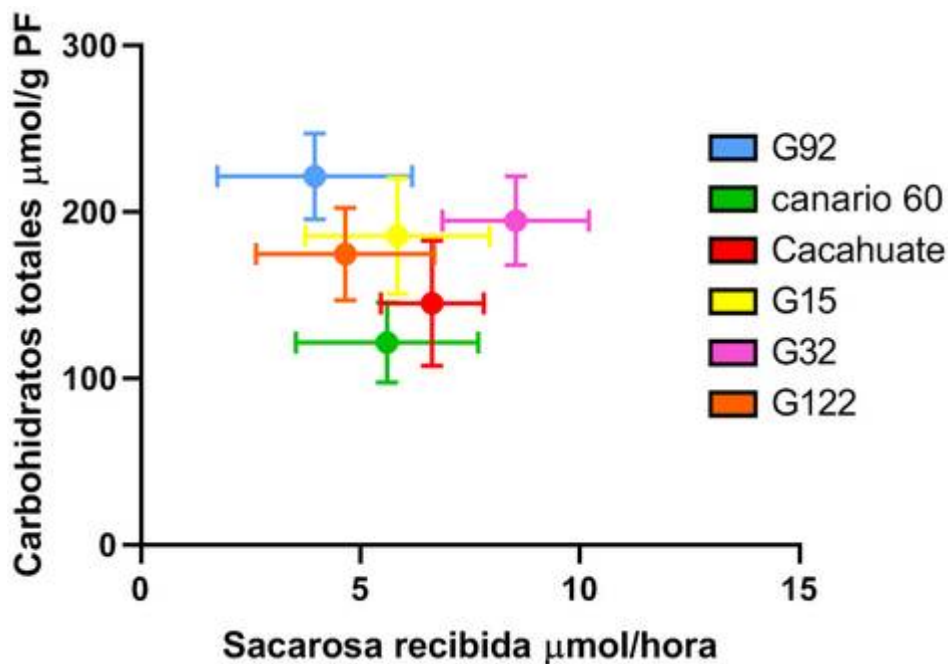


Figura 9. Correlación entre la cantidad de sacarosa recibida por los frutos y la cantidad de carbohidratos totales almacenados en las vainas de frutos de frijol a los 15 DDA de los genotipos G92, canario 60, cacahuete, G15, G32 y G122. Los puntos representan el valor de la media de ambos parámetros +/- DE. DE: desviación estándar.

7.3 Distribución de los carbohidratos presentes en la vaina

Si la cantidad de carbohidratos totales presentes en las vainas no está relacionada con la de sacarosa que reciben los frutos, es probable que las diferencias en la cantidad de los carbohidratos acumulados en las vainas se deban a la forma o eficiencia en la que se metaboliza la sacarosa que reciben los frutos. Con la finalidad de evaluar esta posibilidad, se analizó la distribución de los carbohidratos acumulados en las vainas.

Los resultados obtenidos se encuentran en la Figura 10, donde se puede apreciar que, en la mayoría de los genotipos, la fructosa es el carbohidrato que está presente en mayor cantidad y que la sacarosa es el menos abundante. Las cantidades de glucosa y almidón fueron similares en la mayoría de los genotipos, a excepción de G92 y G32, donde la cantidad presente de almidón fue mayor que la de glucosa.

En la misma gráfica puede apreciarse que los genotipos canario 60 y cacahuate fueron claramente los que almacenaron la menor cantidad de fructosa, mientras que los niveles más altos se observaron en los genotipos G122, G92 y G15.

La mayor cantidad de almidón se encontró en las vainas de los genotipos G92 y G32; mientras que las cantidades más bajas se observaron en las vainas de los genotipos canario 60, cacahuate, G15 y G122.

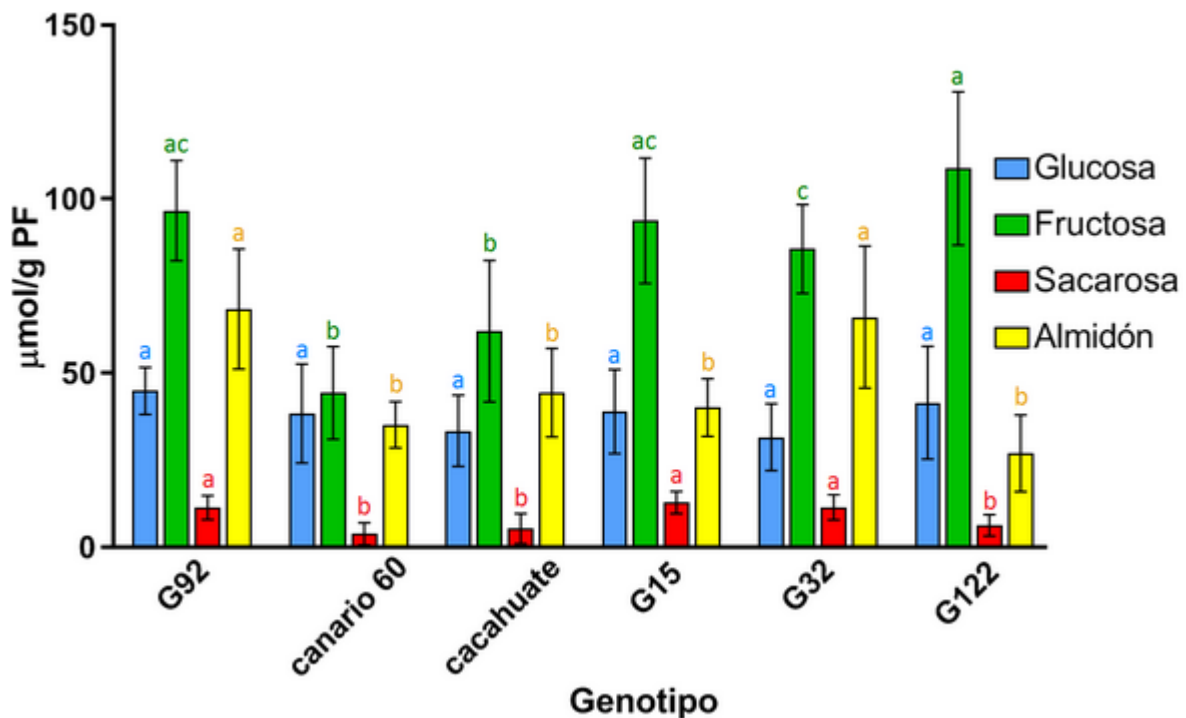


Figura 10. Cantidades de glucosa, fructosa, sacarosa y almidón en vainas de frutos de frijol a los 15 DDA de los genotipos G92, canario 60, cacahuate, G15, G32 y G122. Las barras representan el valor de la media \pm DE. Para cada carbohidrato, las barras identificadas con la misma letra no son significativamente diferentes en el contenido del carbohidrato correspondiente a su respectivo color de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). $n=10$ muestras para fructosa, glucosa y sacarosa en todos los genotipos. $n=10$ muestras para almidón en G92, canario 60, cacahuate, G15 y G32. $n= 8$ muestras para almidón en G122.

La acumulación de fructosa en las vainas de los frutos puede deberse a que la actividad de las enzimas responsables de su fosforilación no es suficiente. Con el fin de explorar esa posibilidad, la siguiente etapa consistió en medir la actividad de las enzimas que fosforilan fructosa y glucosa.

7.4 Actividad enzimática de las glucocinasas (GLKs)

Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 11. El ANOVA indica que hay diferencias moderadas, en la actividad específica de las GLKs entre genotipos. La prueba de Tukey con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$ mostró que los genotipos G92 y G15 tienen las actividades más bajas, y que la más elevada corresponde a cacahuete.

Sin embargo, las diferencias no parecen ser relevantes, pues como se mostró en la Figura 10, no hay diferencias en la cantidad de glucosa presente en las vainas de los frutos de los genotipos analizados.

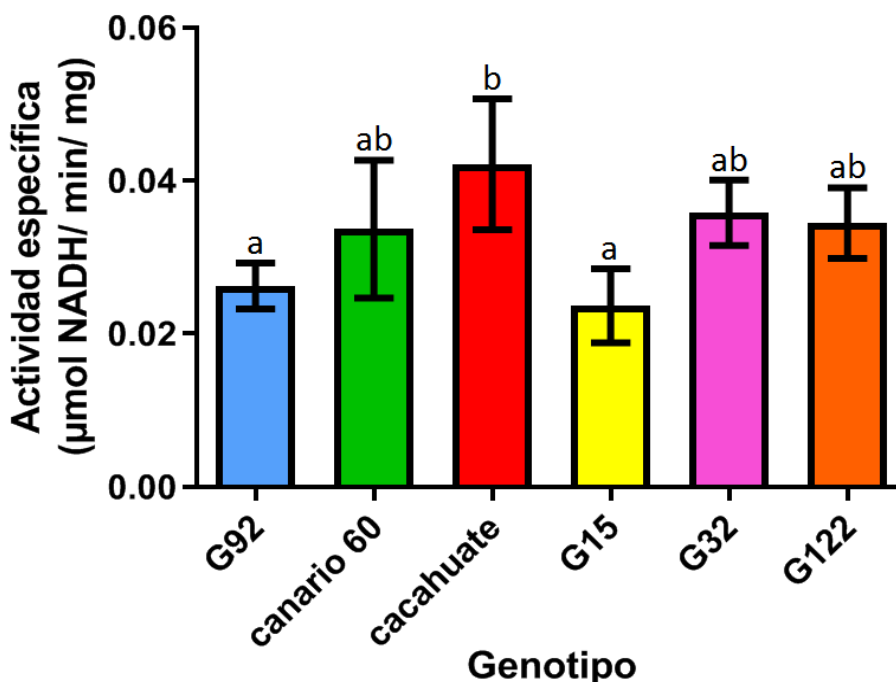


Figura 11. Actividad específica de las glucocinasas presentes en vainas de frutos de frijol a los 15 DDA de los genotipos G92, canario 60, cacahuete, G15, G32 y G122. Las barras representan el valor de la media \pm DE. Las barras identificadas con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). $n=5$ muestras para canario 60, cacahuete, G15, G32 y G122. $n=4$ muestras para G92. DE: desviación estándar.

7.5 Actividad enzimática de las fructocinasas (FRKs)

A diferencia de la actividad de la GLK, la de FRK se distingue por presentar inhibición parcial por sustrato, por lo que, para determinar los parámetros cinéticos, se requirió medir la actividad enzimática a diferentes concentraciones de fructosa en presencia de una cantidad suficiente de ATP (el otro sustrato de la FRK). En los resultados que se muestran en la Figura 12 se aprecia que en todos los genotipos ocurrió una inhibición parcial por fructosa a partir de una concentración de 0.2 mM de fructosa y que la actividad se mantiene con pocos cambios a partir de concentraciones superiores a 1 mM.

Adicionalmente se hizo un análisis similar usando diferentes concentraciones del otro sustrato que es el ATP y a una concentración de fructosa de 0.2 mM (concentración a la que se observó la actividad más alta). En este caso, el comportamiento cinético fue de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten (Figura 13).

Los datos obtenidos se usaron para obtener los parámetros cinéticos aplicando la ecuación correspondiente según el sustrato en el programa GraphPad Prism.

7.5.1 Parámetros cinéticos de la actividad de fructocinasa para el sustrato ATP

Los resultados arrojados por el programa se encuentran en la Tabla 2, en la cual se puede observar que la mayor diferencia en los valores aparentes de $K_{m_{ATP}}$ se encuentra entre los genotipos canario 60 y G15, cuyos valores de $K_{m_{ATP}}$ son 0.243 ± 0.013 mM y 0.442 ± 0.049 mM respectivamente, siendo el valor de $K_{m_{ATP}}$ de G15 aproximadamente 1.82 veces más grande que el de canario 60.

La mayor diferencia en los valores aparentes de $V_{max_{ATP}}$ se encuentra entre los genotipos cacahuate y G32, cuyos valores son 0.0561 ± 0.0047 $\mu\text{mol NADH}/\text{min}/\text{mg}$ y 0.0759 ± 0.0040 $\mu\text{mol NADH}/\text{min}/\text{mg}$ respectivamente, en este caso, el valor de $V_{max_{ATP}}$ de G32 es aproximadamente 1.36 veces más grande que el de cacahuate.

Se calculó el parámetro $V_{max_{ATP}}/K_{m_{ATP}}$ (Tabla 2), y se encontró una diferencia clara entre el genotipo canario 60 con el resto de los genotipos, que tienen valores muy parecidos entre ellos.

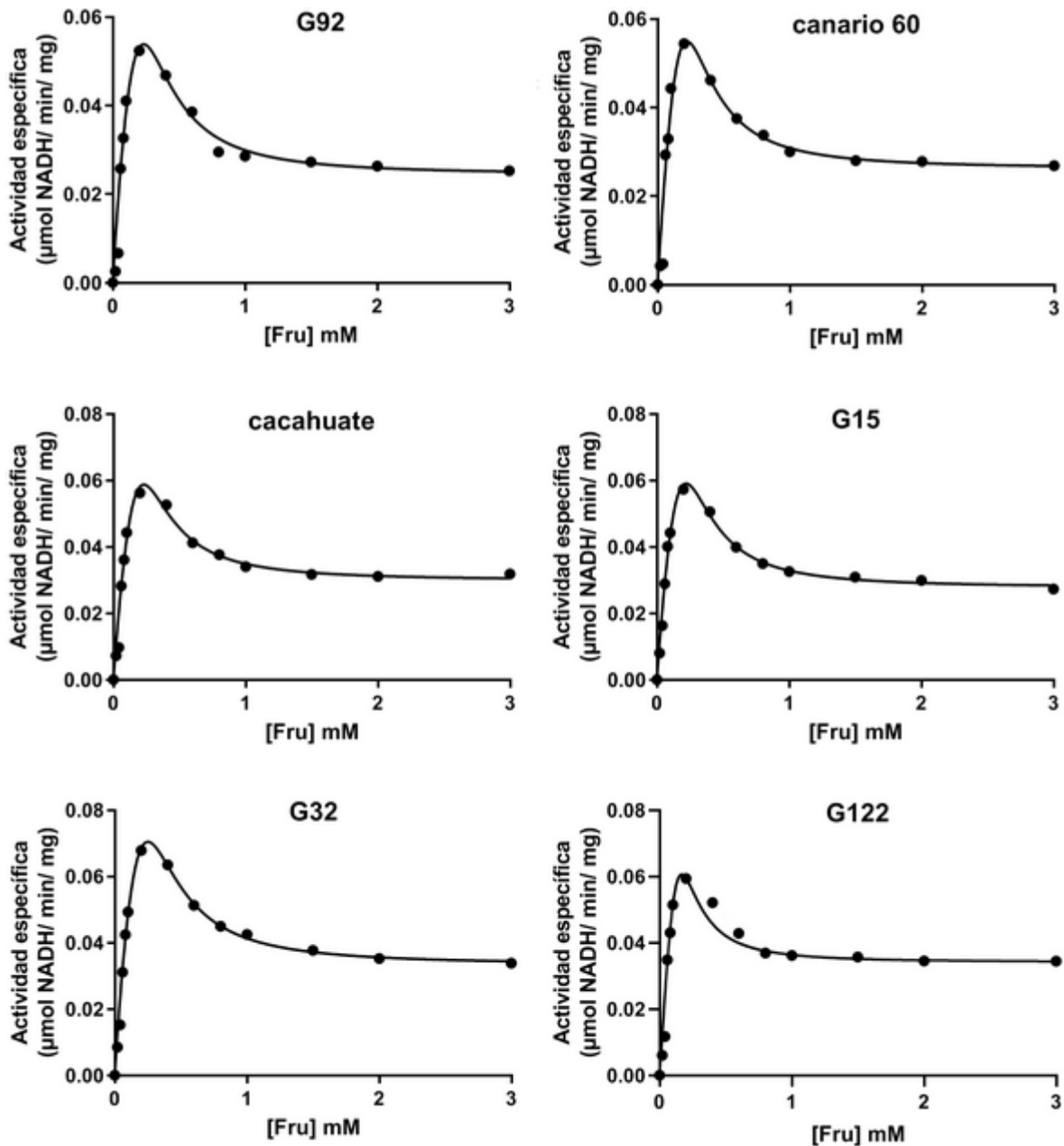


Figura 12. Curvas de saturación por fructosa de las fructocinasas de frutos de frijol de 15 DDA. Todos lo genotipos mostraron inhibición por fructosa a partir de 0.2 mM. Las curvas se ajustaron a la ecuación de inhibición parcial por sustrato con el programa GraphPad Prism.

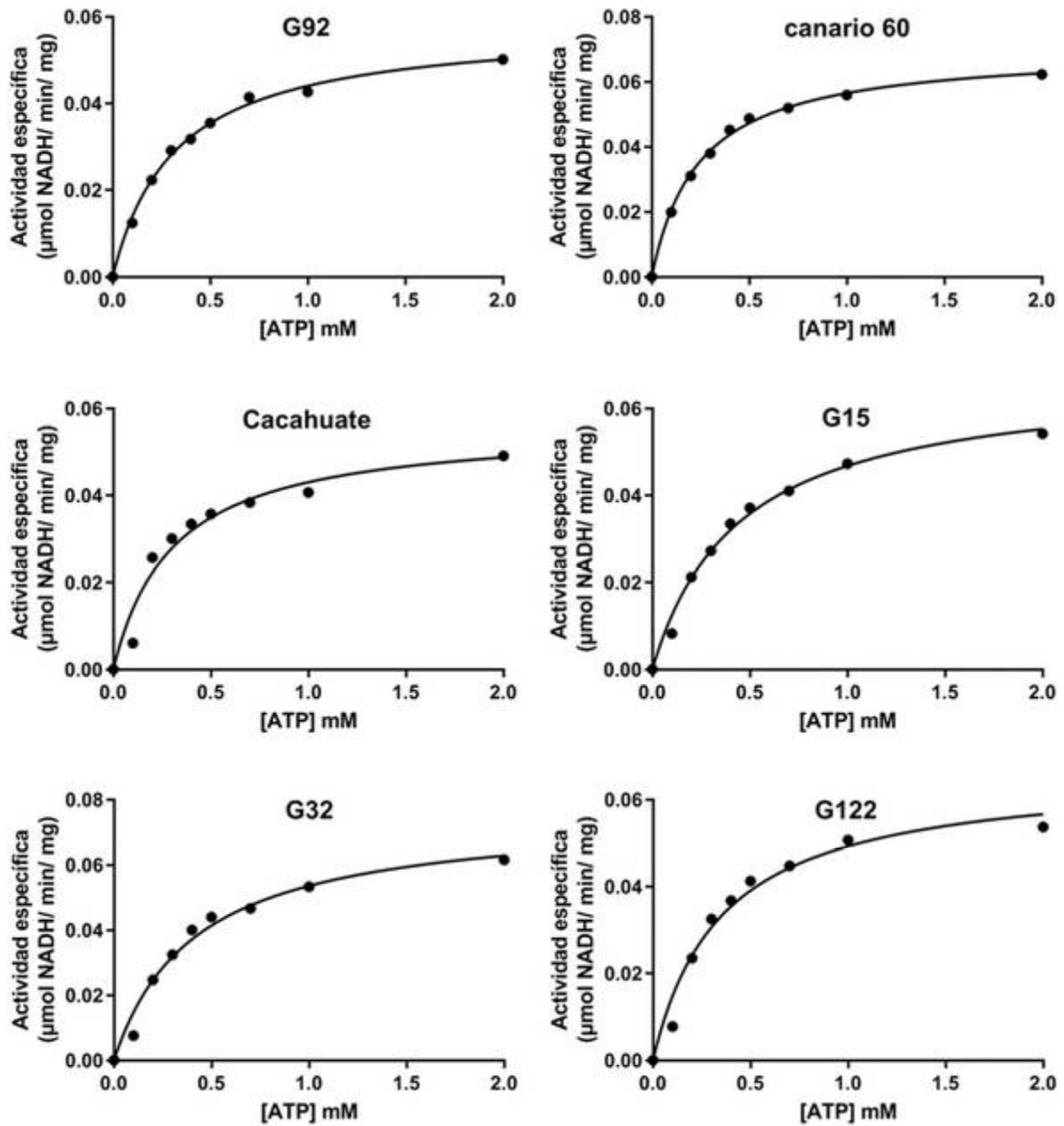


Figura 13. Curvas de saturación por ATP de las fructocinasas presentes en vainas de frutos de frijol a los 15 DDA. Todos los genotipos se ajustaron a la ecuación de la cinética de Michaelis-Menten en el programa GraphPad Prism.

Tabla 2. Valores de los parámetros cinéticos para el sustrato ATP de la actividad de fructocinasa presente en extractos de vainas de frutos de frijol de 15 DDA de los genotipos G92, canario 60, cacahuate, G15, G32 y G122.

Genotipo	$V_{max\ ATP}$ ($\mu\text{mol NADH}/$ min/ mg)	$K_m\ ATP$ (mM)	$V_{max\ ATP}/$ $K_m\ ATP$
G92	0.0582 ± 0.0014	0.321 ± 0.023	0.181 ± 0.019
canario 60	0.0702 ± 0.0011	0.243 ± 0.013	0.289 ± 0.021
cacahuate	0.0561 ± 0.0047	0.305 ± 0.074	0.184 ± 0.079
G15	0.0675 ± 0.0030	0.442 ± 0.049	0.153 ± 0.027
G32	0.0759 ± 0.0040	0.417 ± 0.070	0.182 ± 0.049
G122	0.0666 ± 0.0046	0.351 ± 0.066	0.190 ± 0.060

\pm Indica el error estándar arrojado por el programa.

7.5.2 Parámetros cinéticos de la actividad de fructocinasa para el sustrato fructosa

Los resultados arrojados por el programa se encuentran en la Tabla 3, en este caso, los datos se ajustaron a la ecuación que describe una inhibición parcial por sustrato (ver sección de Metodologías). Como se puede apreciar, las curvas de las gráficas de actividad se ajustan de buena manera, sin embargo, el programa no fue capaz de establecer valores confiables de $K_m\ fru$, $V_{max\ fru}$ y K_i ; por esta razón, el valor de K_i se fijó manualmente y por ello no tiene valores de error estándar. Después de eso, el programa permitió estimar valores de $K_m\ fru$ y $V_{max\ fru}$ con un error estándar aceptable, que por lo anterior, deben ser considerados como valores aparentes.

El único parámetro cinético que se ajustó bien en el programa, y que por lo tanto es el más confiable, es $V_{max\ inh}$, que corresponde a la velocidad máxima cuando se alcanza la meseta y aumentar la concentración de fructosa ya no afecta la actividad. Los valores de $V_{max\ inh}$ no son tan diferentes entre genotipos, la mayor diferencia se encuentra entre G92 y G122 cuyos valores de $V_{max\ inh}$ son $0.0180 \pm 0.0026 \mu\text{mol NADH}/\text{min}/\text{mg}$ y $0.0277 \pm 0.0028 \mu\text{mol NADH}/\text{min}/\text{mg}$ respectivamente, el valor de

$V_{max\text{ inh}}$ de G122 es 1.54 veces más grande que el de G92. Los valores de $V_{max\text{ inh}}$ de los demás genotipos están bastante cerca entre ellos, lo que indica que no hay diferencias entre genotipos en la actividad de las fructocinasas una vez que se ha alcanzado la inhibición máxima por fructosa, lo que en todos los casos ocurrió cuando la concentración de fructosa fue mayor a 0.2 mM.

Tabla 3. Valores de los parámetros cinéticos para el sustrato fructosa de las enzimas fructocinasas presentes en vainas de frutos de frijol a los 15 DDA de los genotipos G92, canario 60, cacahuate, G15, G32 y G122.

Genotipo	** $V_{max\text{ fru}}$ ($\mu\text{mol NADH/}$ min/ mg)	$V_{max\text{ inh}}$ ($\mu\text{mol NADH/}$ min/ mg)	** $K_m\text{ fru}$ mM	* $K_i\text{ fru}$ mM
G92	0.828 \pm 0.049	0.0180 \pm 0.0026	1.679 \pm 0.158	0.018
canario 60	1.075 \pm 0.077	0.0200 \pm 0.0029	2.090 \pm 0.223	0.013
cacahuate	0.888 \pm 0.051	0.0234 \pm 0.0039	1.705 \pm 0.148	0.017
G15	1.388 \pm 0.079	0.0209 \pm 0.0025	2.613 \pm 0.221	0.011
G32	1.484 \pm 0.078	0.0248 \pm 0.0031	2.662 \pm 0.213	0.015
G122	0.734 \pm 0.059	0.0277 \pm 0.0028	1.142 \pm 0.137	0.017

\pm Indica el error estándar arrojado por el programa. *Indica que el ajuste se hizo manualmente. **Indica que el ajuste lo hizo el programa una vez que se fijó el valor de K_i obtenido después del ajuste manual.

7.6 Inmunodetección de las fructocinasas

Además de las características cinéticas de las fructocinasas, la cantidad de enzima también podría influir en la capacidad de las vainas para metabolizar la fructosa.

En el SDS-PAGE que se muestra en la Figura 14A corresponde al análisis de extractos de vainas de 15 DDA. En la Figura 14B se muestra el Western blot para fructocinasa y la Figura 14C corresponde a un Western blot usando anticuerpos contra la subunidad grande de la Rubisco. Como se puede apreciar, los anticuerpos contra fructocinasa parecen reconocer dos bandas de tamaños muy similares. En la mayoría de los casos, la banda más pequeña es la más intensa; sin embargo, en

el genotipo G15 sucede lo contrario. Por otro lado, usando como referencia el gel teñido con azul de Coomassie y el Western blot contra la subunidad grande de la Rubisco, se aprecia que el genotipo 32 es el que tiene mayor cantidad de fructocinasa y que G15 es el que tiene la menor cantidad.

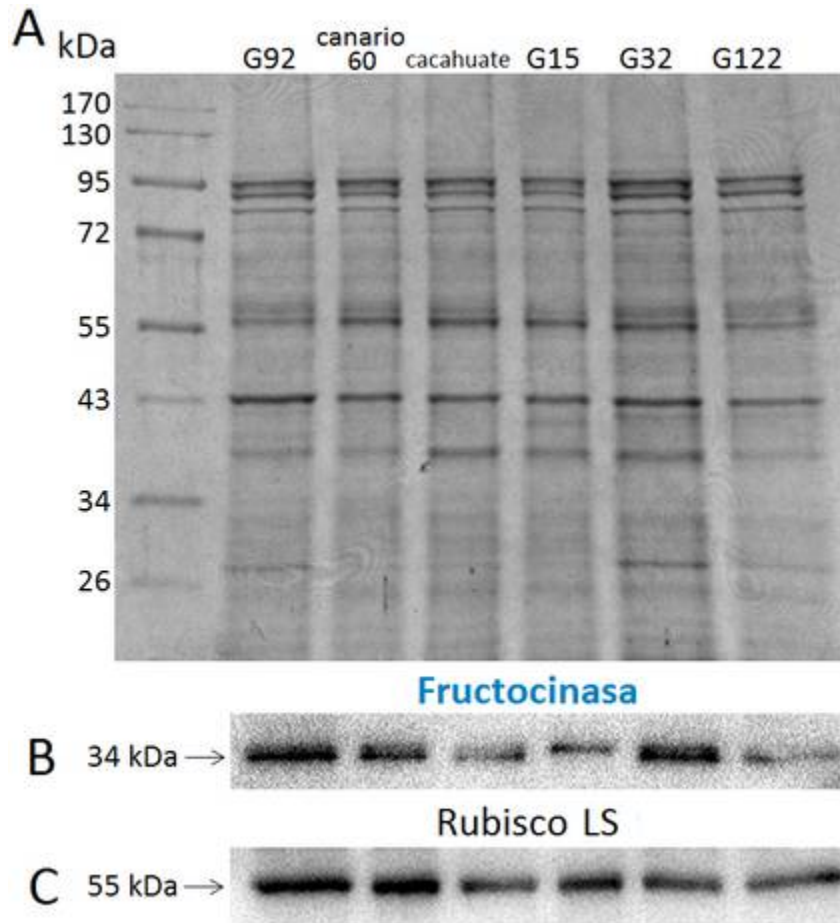


Figura 14. Inmunodetección de las fructocinasas presentes en las vainas de frutos de frijol a los 15 DDA de los genotipos G92, canario 60, cacahuate, G15, G32 y G122. SDS-PAGE de todas las proteínas presentes (A). Western blot de las fructocinasas (B). Western blot de Rubisco LS (C).

8. Discusión

La cantidad de carbohidratos totales en las vainas fue diferente entre los genotipos analizados, destacando canario 60 con el valor más bajo y G92 con el más elevado (Figura 7). Sin embargo, como se puede apreciar en la Figura 9, esta característica no siempre está directamente relacionada con el flujo de sacarosa al fruto; en tres genotipos (canario 60, cacahuete y G32) hay una buena correlación, y en los otros tres (G92, G15 y G122) no la hay. Esto abre la posibilidad de que los procesos metabólicos que sufre la sacarosa una vez que llega a la vaina también pudieran influir en las diferencias entre genotipos.

Esta suposición contrasta con los resultados reportados por Dai *et al.*, (2016), quienes encontraron que, en melocotón, uva, tomate y tomate cherry, el flujo de sacarosa hacia los frutos es la principal causa de las diferencias en el contenido de carbohidratos solubles de los frutos y que los procesos metabólicos que pudieran sufrir no tenían un efecto importante. Es probable que la naturaleza de los materiales analizados tenga que ver con las diferencias entre los resultados reportados por Dai *et al.*, (2016) y los que se obtuvieron en este trabajo. Mientras que las características de los frutos han sido seleccionadas para acumular azúcares, las vainas de los frutos de frijol son estructuras diseñadas para proteger y facilitar el desarrollo de las semillas.

El análisis de la distribución de los azúcares presentes en la vaina mostró que las cantidades de sacarosa y glucosa son muy similares entre los genotipos analizados, pero hay grandes diferencias en las cantidades de fructosa y almidón (Figura 10). En general, fructosa fue el carbohidrato más abundante seguido de almidón y glucosa, mientras que las cantidades de sacarosa fueron claramente menores.

En términos generales, nuestros resultados coinciden con los de un estudio realizado en vainas de frijol por Gartner *et al.*, (2020), quienes también encontraron que, en etapas tempranas del desarrollo de los frutos, las concentraciones de glucosa y fructosa son más altas que las de sacarosa. La alta actividad de la invertasa que se observa en las primeras etapas del desarrollo del fruto (Sturm,

1999) explicaría por qué hay más fructosa y glucosa que sacarosa, pero no el hecho de que en casi todos los genotipos (excepto canario 60) haya más fructosa que glucosa. En un estudio realizado por Sung *et al.*, (1994) se reporta que en vainas de frijol más allá de los 10 a 14 DDA, la actividad de sacarosa sintasa aumenta mientras que la de la invertasa disminuye, lo que facilitaría el consumo de glucosa. Si la fosforilación de fructosa limitara su uso, el resultado sería su acumulación. En este trabajo analizamos las vainas de frutos de 15 DDA y es posible que la acumulación de fructosa que observamos refleje el cambio en la forma de metabolizar la sacarosa.

Las vainas de los frutos de frijol también se distinguen por acumular una cantidad importante de almidón (Figura 10). En el estudio realizado por Belmont *et al.*, (2020) se encontró que las vainas alcanzan la cantidad máxima a los 20 DDA, y que lo degradan cuando las semillas entran en la etapa de crecimiento rápido. Dada la magnitud de la acumulación de fructosa en las vainas de los genotipos analizados, en este trabajo se usaron frutos de 15 DDA para investigar si su fosforilación está relacionada con la acumulación de almidón.

Las enzimas responsables de la fosforilación de hexosas se conocen genéricamente como hexocinasas; sin embargo, se les clasifica en glucocinasas y fructocinasas por la preferencia de sus sustratos. La medición de la actividad de glucocinasa mostró diferencias importantes entre genotipos siendo mayor la observada en G32 (Figura 11). Dado que la cantidad de glucosa fue muy similar en todos los genotipos (Figura 10), asumimos que las diferencias en la actividad de glucocinasa no tienen un impacto en el metabolismo de azúcares en la vaina; pues las diferencias en la actividad de las glucocinasas no se reflejaron en la cantidad de glucosa presente.

Por otro lado, en las gráficas de saturación por fructosa se observa que las fructocinasas de todos los genotipos muestran inhibición parcial por fructosa (Figura 12). Esta característica ya ha sido documentada en varias especies de plantas, sin embargo, se han reportado diferencias en las concentraciones de fructosa a las que se observa este fenómeno, las cuales suelen estar en el rango de 0.5 a 2 mM (Stein

y Granot, 2018); aunque en caña de azúcar la inhibición se hizo evidente a partir de 0.1 mM (Hoepfner *et al.*, 2004). En este trabajo, la observamos con claridad a partir de 0.2 mM. La cantidad de fructosa en vainas de 15 DDA es cercana a 80 $\mu\text{mol/g}$ PF, asumiendo que el 80% es agua, estimamos 100 $\mu\text{mol/mL}$; lo que se traduce en una concentración intracelular aproximada de 100 mM. Esta es una estimación vaga porque desconocemos como está compartamentalizada en la célula. Sin embargo, es sugerente que la metabolización de la fructosa *in vivo* efectivamente esté limitada por la inhibición que tales concentraciones pueden producir en la actividad de las fructocinasas.

En lo que se refiere a la medición de la actividad de fructocinasas, los resultados no mostraron diferencias tan importantes entre genotipos. Cabe mencionar que los valores de $V_{\text{max ATP}}$ y $K_{\text{m ATP}}$ son aparentes, pues la concentración de fructosa que se usó (0.2 mM, a partir de la cual empieza a tener un efecto inhibitorio) permite obtener la velocidad más alta, pero tal vez no es saturante. Los valores del parámetro $V_{\text{max ATP}}/K_{\text{m ATP}}$ (que proporciona información sobre la eficiencia catalítica al utilizar ATP como sustrato) mostró valores muy similares en todos los genotipos con excepción de canario 60 donde el valor fue claramente más elevado (Tabla 2), esto sugiere que canario 60 es el genotipo cuyas fructocinasas utilizan mejor al ATP.

Debido a que los parámetros $K_{\text{m fru}}$, $V_{\text{max fru}}$ y K_i se ajustaron manualmente, sus valores se consideran solo una aproximación de las diferencias entre genotipos. En este caso el parámetro $V_{\text{max inh}}$ es el más confiable y nos habla de la actividad de las fructocinasas cuando existe inhibición por fructosa que como se mencionó anteriormente, es muy probable que esté ocurriendo *in vivo*. En la Tabla 3 se observa que G92 es el genotipo que presenta la menor actividad y G122 la más elevada, mientras que los valores de los demás genotipos son muy similares entre ellos; sin embargo, estas diferencias no son tan importantes y no se relacionan directamente con la cantidad de fructosa almacenada.

Por otro lado, las fructocinasas están codificadas por una familia de genes y las mediciones que realizamos corresponden al promedio de las que en ese momento se están expresando.

Pese a las limitaciones mencionadas en los parámetros cinéticos, es evidente que los valores aparentes de K_i son mucho más bajos (cerca de 100 veces) que los de $K_{m_{fru}}$, sugiriendo que la inhibición por fructosa es muy fuerte en todos los genotipos y podría ser fisiológicamente relevante.

Finalmente, de acuerdo a lo observado en el Western blot, se evidencia que la cantidad de enzima es diferente entre genotipos, pero no observamos una relación evidente con la cantidad de fructosa presente en las vainas. En el caso del genotipo 122, la alta cantidad de fructosa podría explicarse por la baja cantidad de fructocinasa; sin embargo, las vainas del genotipo 92 tienen alta cantidad de fructosa y de enzima (Figuras 10 y 14B). El análisis por Western blot detecta dos bandas de tamaño muy similar y cuyas abundancias cambian entre genotipos. Es probable que el análisis de las propiedades cinéticas de ambas isoformas ayude a explicar las peculiaridades del metabolismo de fructosa en las vainas de los frutos de frijol.

9. CONCLUSIONES

Hay diferencias en la cantidad de carbohidratos totales (fructosa, glucosa, sacarosa y almidón) almacenados en la vaina entre los genotipos estudiados.

La cantidad de sacarosa suministrada a los frutos no está correlacionada con la cantidad de carbohidratos almacenados en la vaina.

Las propiedades cinéticas de la actividad de fructocinasa fueron muy similares en todos los genotipos.

Nuestros resultados no permiten correlacionar las propiedades cinéticas de las fructocinasas con la forma en cómo se metabolizan los azúcares en las vainas de los frutos de frijol.

10. PERSPECTIVAS

Aún queda por dilucidar si la localización celular de la fructosa y de las isoformas de las fructocinasas influyen en la cantidad de fructosa almacenada en la vaina de los frutos de frijol y cómo lo hacen si ese es el caso.

Es necesario analizar el transporte de los azúcares hacia las semillas, estudiarlo ayudaría a entender mejor la forma en que la vaina contribuye al desarrollo de la semilla y el papel de las fructocinasas en el metabolismo de carbohidratos.

Un estudio de las enzimas invertasa y sacarosa sintasa en cada genotipo complementaría lo observado aquí respecto al metabolismo de los azúcares.

11. REFERENCIAS

- Araki, T., Kitano, M., Eguchi, H. (1997). *Evaluation of photoassimilate flux through a tomato pedicel*. Biotronics. 26, 21-29.
- Belmont, R., Bernal, L., Padilla-Chacón, D., Coello, P., Martínez-Barajas, E. (2022). *Starch accumulation in bean fruit pericarp is mediated by the differentiation of chloroplasts into amyloplasts*. Plant Science. 316, 111163.
- 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*. Journal of Plant Physiology. 162, 970-976.
- Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA). (2020). *Mercado del frijol, situación y prospectiva*. Palacio Legislativo de San Lázaro.
- Celis-Velázquez, R., Peña-Valdivia, C., Luna-Cavazos, M., Aguirre, J. (2010). *Seed morphological characterization and reserves used during seedling emergency of wild and domesticated common bean (Phaseolus vulgaris L.)*. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 27, 61-87.
- Coello, P., Martínez-Barajas, E. (2016). *Changes in nutrient distribution are part of the mechanism that promotes seed development under severe nutrient restriction*. Plant Physiology Biochemistry. 99, 21–26.
- Dai, Z., Wu, H., Baldazzi, V., van Leeuwen, C., Bertin, N., Gautier, H., Wu, B., Duchêne, E., Gomès, E., Delrot, S., Lescourret, F., Génard, M. (2016). *Inter-Species Comparative Analysis of Components of Soluble Sugar Concentration in Fleshy Fruits*. Frontiers in Plant Science. 7, 649.
- Fernández, F., Gepts, P., López, M. (1986). *Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (Phaseolus vulgaris L.)*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 33 páginas.
- Gartner, W., Bethke, P., Kisha, T., Nienhuis, J. (2020). *Changes in Sugar Concentrations of Seed and Pod Tissue During Development in Snap and Dry Beans (Phaseolus vulgaris L.)*. HortScience. 55 (10), 1692-1697.

- Geigenberger, P. (2011). *Regulation of Starch Biosynthesis in Response to a Fluctuating Environment*. *Plant Physiology*. 155, 1566-1577.
- German, M., Asher, I., Petreikov, M., Dai, N., Schaffer, A., Granot, D. (2004). *Cloning, expression and characterization of LeFRK3, the fourth tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) gene encoding fructokinase*. *Plant Science*. 166, 285-291.
- Granot, D. (2007). *Role of tomato hexose kinases*. *Functional Plant Biology* 34, 564-570.
- Granot, D., David-Schwartz, R., Kelly, G. (2013). *Hexose kinases and their role in sugar-sensing and plant development*. *Frontiers in Plant Science*. 4, 44.
- Granot, D., Kelly, G., Stein, O. y David-Schwartz, R. (2014). *Substantial roles of hexokinase and fructokinase in the effects of sugars on plant physiology and development*. *Journal of Experimental Botany*. 65 (3), 809-819.
- Hoepfner, S., Botha, F. (2004). *Purification and characterisation of fructokinase from the culm of sugarcane*. *Plant Science*. 167, 645-654.
- Huber, S. (1989). *Biochemical Mechanism for Regulation of Sucrose Accumulation in Leaves during Photosynthesis*. *Plant Physiology*. 91, 656-662.
- Riggs, J., Cavales, P., Chapiro, S., Callis, J. (2017). *Identification and biochemical characterization of the fructokinase gene family in *Arabidopsis thaliana**. *BMC Plant Biology*. 17, 83.
- Jones, J. (1982). *Hydroponics: its history and use in plant nutrition studies*. *Journal of Plant Nutrition*. 5, 1003-1030.
- Laemmli, U. (1970). *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*. *Nature*. 227, 680-685.
- Lara, M. (2015). *El cultivo del frijol en México*. Escuela Nacional de Estudios Superiores, UNAM. 16 (2).
- McCormick, A., Watt, D., Cramer, M. (2009). *Supply and demand: sink regulation of sugar accumulation in sugarcane*. *Journal of Experimental Botany*. 60 (2), 357-364.

- Mukherjee, T., Ivanova, M., Dagda, M., Kanayama, Y., Granot D., Holaday, S. (2015). *Constitutively overexpressing a tomato fructokinase gene (LeFRK1) in cotton (Gossypium hirsutum L. cv. Coker 312) positively affects plant vegetative growth, boll number and seed cotton yield*. Functional Plant Biology. 42, 899-908.
- Odanaka, S., Bennett, A., Kanayama, Y. (2002). *Distinct physiological roles of fructokinase isozymes revealed by gene-specific suppression of Frk1 and Frk2 expression in tomato*. Plant Physiology. 129, 1119-1126.
- Pego, J., Smeekens, C. (2000). *Plant fructokinases: a sweet family get-together*. Trends in Plant Science. 5 (12), 531-536.
- Peña-Valdivia, C., García, N., Aguirre, R., Ybarra-Moncada, M., López, H. (2011). *Variation in physical and chemical characteristics of common bean (Phaseolus vulgaris L.) grain along a domestication gradient*. Chemistry and Biodiversity. 8 (12), 2211-2225.
- Rodríguez, R. (2019). *Estudio del papel de la vaina en el desarrollo de semillas de frijol*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cuellar-Ortiz, S., Arrieta-Montiel, M., Acosta-Gallegos, J., Covarrubias, A. (2008). *Relationship between carbohydrate partitioning and drought resistance in common bean*. Plant, Cell and Environment. 31, 1399-1409.
- Schaffer, A., Petreikov, M. (1997). *Sucrose-to-starch metabolism in tomato fruit undergoing transient starch accumulation*. Plant Physiology. 113, 739-746.
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). (2019). *La importancia del frijol en México*. Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/la-importancia-del-frijol-en-mexico>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). (2022). *Estima Agricultura crecimiento de 11.4% de la producción de frijol en 2021; mantiene tendencia al alza*. Disponible en:

<https://www.gob.mx/agricultura/prensa/estima-agricultura-crecimiento-de-11-4-de-la-produccion-de-frijol-en-2021-mantiene-tendencia-al-alza?idiom=es%2%A0>

- SAGARPA. (2017). *FRIJOL Mexicano*. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. Primera edición 2017.
- Stein, O., Granot, D. (2018). *Plant Fructokinases: Evolutionary, Developmental, and Metabolic Aspects in Sink Tissues*. *Frontiers in Plant Science*. 9, 339.
- Stirbet, A., Lazar, D., Guo, Y., Govindjee, G. (2020). *Photosynthesis: basics, history and modelling*. *Annals of Botany*. 126, 511-537.
- Sturm, A. (1999). *Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning*. *Plant Physiology*. 121, 1-8.
- Sung, S., Sheih, W., Geiger, D., Black, C. (1994). *Growth, sucrose synthase, and invertase activities of developing *Phaseolus vulgaris* L. fruits*. *Plant, Cell and Environment*. 17, 419-426.
- Tofiño, A., Fregene, M., Ceballos, H., Cabal, D. (2006). *Regulación de la biosíntesis del almidón en plantas terrestres: perspectivas de modificación*. *Acta Agronómica*. 55 (1).
- Treviño, C., Rosas, R. (2013). *El frijol común: factores que merman su producción*. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana*. 16 (1).