



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DE LA ENZIMA ADP-GLUCOSA PIROFOSFORILASA EN  
VAINAS DEL FRUTO DE FRIJOL**

**TESIS**

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

**PRESENTA**

**GERARDO CONTRERAS RUIZ**



**CDMX**

**2023**



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: DR. J. ELEAZAR MARTINEZ BARAJAS**

**VOCAL:**                           **Profesor: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI**

**SECRETARIO:**               **Profesor: DR. EUCLIDES ÁVILA CHÁVEZ**

**1er. SUPLENTE:**               **Profesora: DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA**

**2º SUPLENTE:**               **Profesora: DRA. MARÍA DEL CONSUELO PLATA RAMOS**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 102, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, CONJUNTO E,  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

### **ASESOR DEL TEMA:**

**Dr. J. Eleazar Martínez Barajas**

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

**Dra. Lilia Angélica Bernal Gracida**

### **SUSTENTANTE (S):**

**Gerardo Contreras Ruiz**

## **Agradecimientos**

El trabajo de tesis “**Estudio de la enzima ADP-glucosa Pirofosforilasa en vainas del fruto de frijol**” realizado por **Gerardo Contreras Ruiz**, fue desarrollado bajo la dirección del **Dr. J. Eleazar Martínez Barajas**, con la dirección técnica de **la Dra. Lilia Angélica Bernal Gracida** en el laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo generoso recibido de:

DGAPA-UNAM PAPIIT IN226520

Facultad de Química de la UNAM, PAIP 5000-9127

A los miembros del jurado, al Dr. J. Eleazar Martínez Barajas, al Dr. José Pedraza Chaverri y al Dr. Euclides Ávila Chávez, por sus adecuados comentarios y sugerencias para mejorar el presente trabajo.

A la Dra. Lilia Angélica Bernal Gracida por el apoyo recibido en la revisión de este trabajo.

## ÍNDICE

1. Resumen .....	1
2. Introducción .....	3
2.1 Taxonomía del frijol .....	3
2.2 Origen del frijol .....	3
2.3 Características de cultivo del frijol .....	5
2.4 Etapas de crecimiento del cultivo de frijol .....	5
2.5 Importancia nutricional del frijol .....	7
2.6 Vaina de fruto de frijol.....	11
2.7 Desarrollo de la semilla de frijol.....	11
2.8 El almidón en vainas de fruto de frijol.....	12
2.9 Almidón.....	14
2.10 Síntesis del almidón .....	17
2.11 ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa) .....	22
2.12 Regulación de la ADP-glucosa pirofosforilasa .....	25
2.12.1 Regulación alostérica de la ADP-glucosa pirofosforilasa .....	26
2.12.2 Regulación redox de la ADP-glucosa pirofosforilasa .....	26
2.12.3 Fosforilación de la ADP-glucosa pirofosforilasa .....	27
2.12.4 Regulación transcripcional de la ADP-glucosa pirofosforilasa .....	27
3. Justificación .....	29
4. Hipótesis .....	29
5. Objetivo general.....	29
6. Objetivos particulares .....	29
7. Material y Métodos .....	30
7.1 Análisis bioinformático.....	30
7.2 Material biológico.....	30
7.3 Medición de la expresión de genes de las subunidades de AGPasa en vaina de fruto de frijol de 10, 15 y 20 DDA. ....	31
7.3.1 Diseño de oligonucleótidos para PCR de las subunidades de AGPasa de frijol... ..	31
7.3.2 Extracción de RNA .....	32
7.3.3 Síntesis de cDNA (transcripción inversa).....	33
7.3.4 PCR.....	33
7.4 Análisis de la enzima AGPasa en vainas de fruto de frijol de 10, 15 y 20 DDA.....	34
7.4.1 Extracción de Proteínas .....	34
7.4.2 Cuantificación de Proteínas .....	34

7.4.3	Medición de la actividad de la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa).....	35
7.4.4	Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) .....	36
7.4.5	Inmunodetección de la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa).....	36
8.	Resultados.....	37
8.1	Análisis bioinformático de los genes que codifican a las subunidades de AGPasa .....	38
8.2	Medición de la expresión de los genes de las subunidades de AGPasa en vainas de frutos de frijol.....	47
8.3	Cantidad de AGPasa en vainas de fruto de frijol.....	50
8.3.1	Actividad de AGPasa en vainas de fruto de frijol de 10, 15 y 20 DDA .....	51
9.	Discusión de resultados.....	52
9.1	Análisis bioinformático de los genes que codifican a las subunidades de ADP-glucosa pirofosforilasa .....	52
9.2	AGPasa en la vaina de frijol .....	54
9.2.1	Expresión de los genes que codifican a las subunidades de AGPasa .....	55
9.2.2	Cantidad de proteína y actividad de AGPasa .....	55
10.	Conclusión .....	58
11.	Perspectivas .....	58
12.	Referencias.....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zonas arqueológicas donde se han encontrado señales del proceso de domesticación del frijol.....	4
Figura 2. Etapas de crecimiento del cultivo de frijol.....	6
Figura 3. Producción mundial de frijol, 2000-2013 .....	8
Figura 4. Rendimiento de frijol, 2000-2013 (Toneladas por hectárea). .....	9
Figura 5. Superficie sembrada, cosechada y volumen de producción de frijol en México (2002-2012).....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 6. Imágenes representativas de frutos y semillas de frijol durante el desarrollo. ....	12
Figura 7. Análisis del crecimiento de semillas de frijol.....	13
Figura 8. La composición y estructura de los gránulos de almidón.....	14
Figura 9. Representación esquemática de la ruta de biosíntesis del almidón y el metabolismo relacionado en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos .....	19
Figura 10. Síntesis de almidón a partir de glucosa-1-fosfato.....	20
Figura 11. Representación esquemática de la vía de biosíntesis del almidón, su compartimentación subcelular y distribución del control del flujo en hojas fotosintéticas (A) y tejidos heterótrofos (B).....	24
Figura 12. Regulación de la AGPasa plastidial por múltiples mecanismos. ....	25
Figura 13. Esquema de las reacciones enzimáticas de la medición de actividad AGPasa. ....	35
Figura 14. Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de las subunidades de AGPasa de <i>Arabidopsis</i> , arroz y frijol.....	45
Figura 15. A, integridad de RNA de vainas de fruto de frijol de 10, 15 y 20 DDA. B, integridad de RNA hoja de planta de frijol .....	47
Figura 16. Expresión de genes que codifican subunidades de AGPasa en vainas de fruto de frijol de 10, 15 y 20 DDA. ....	48
Figura 17. Expresión de genes que codifican a subunidades de AGPasa en hojas de frijol.....	49
Figura 18. Representación relativa de los niveles de expresión de los genes que codifican a las subunidades de AGPasa en vaina y hoja .....	50
Figura 19. Análisis de la expresión de la subunidad grande de AGPasa en vainas de frutos de frijol. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 20. Actividad enzimática de AGPasa en vainas de fruto de frijol de 10, 15 y 20 DDA ....	52
Figura 21. Subfuncionalización de las diferentes subunidades AGPasa encontradas en <i>Arabidopsis</i> .....	54
Figura 22. Relación entre la cantidad de almidón (en azul), sacarosa (en verde) y peso de las semillas (en rojo) en la vaina de fruto de frijol del 10 al 30 DDA .....	57

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional del frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) .....	7
Tabla 2. Oligonucleótidos usados para la amplificación por RT-PCR de las subunidades de AGPasa: AGPL1, AGPL2, AGPL3, AGPL4 y AGPS1. ....	31
Tabla 3. Subunidades pequeñas y grandes de ADP-glucosa pirofosforilasa en <i>Arabidopsis</i> . ...	38
Tabla 4. Subunidades de la ADP-glucosa pirofosforilasa en frijol. ....	39
Tabla 5. Subunidades pequeñas y grandes de ADP-glucosa pirofosforilasa en arroz. ....	40
Tabla 6. Clasificación de las subunidades de AGPasa en frijol. ....	46



## **ABREVIATURAS**

3PGA. 3-fosfoglicerato.

ADP. Difosfato de adenosina.

AGPasa. ADP-glucosa pirofosforilasa.

AGPL. ADP-glucosa pirofosforilasa subunidad grande.

AGPS. ADP-glucosa pirofosforilasa subunidad pequeña.

ATP. Trifosfato de adenosina.

BE. Enzima ramificadora.

cDNA. Ácido desoxirribonucleico complementario.

DBE. Enzima desramificadora.

DDA. Días después de ané debate.

DNA. Ácido desoxirribonucleico.

F6P. Fructosa-6-fosfato.

G1P. Glucosa-1-fosfato.

GBSS. Almidón sintasa que se une al gránulo.

GDH. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

NADH. Nicotinamida adenin dinucleótido.

NADPH. Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato.

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa.

PGM. Fosfoglucomutasa.

Pi. Fosfato inorgánico.

PPi. Pirofosfato.

RNA. Ácido ribonucleico.

RT-PCR. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa.

SAE. Solución amortiguadora de extracción.

SS. Almidón sintasa.

TAE. Tris-acetato-EDTA.

TAIR. The Arabidopsis Information Resource

## 1. Resumen

El desarrollo de las semillas es un proceso que demanda grandes cantidades de recursos metabólicos, cuya disponibilidad puede ser afectada por condiciones ambientales. La vaina del fruto de frijol es una estructura que además de proteger a las semillas y distribuir entre ellas los fotosintatos que recibe el fruto, también tiene la capacidad de sintetizar almidón. El almidón es un polisacárido de glucosa conformado por los polímeros amilosa y amilopectina que las plantas usan frecuentemente como reserva de carbono. En el caso de las vainas, la síntesis de almidón permite almacenar los excedentes de sacarosa, y su degradación posterior contribuye a satisfacer las necesidades de las semillas cuando entran en la fase de crecimiento acelerado. La síntesis de almidón es una vía compleja, donde la actividad de la enzima adenin difosfato (ADP)-glucosa pirofosforilasa es clave.

En este trabajo se analizó si su actividad tiene correlación con la cantidad de almidón presente en la vaina durante la primera etapa del desarrollo del fruto. Con ese propósito se realizó un análisis bioinformático de los genes que codifican a las subunidades de la ADP-glucosa pirofosforilasa, se evaluaron sus niveles de expresión, y se cuantificó la abundancia de proteína y la actividad enzimática. El resultado obtenido del análisis bioinformático fue la identificación de siete secuencias de genes que codifican para las subunidades de ADP-glucosa pirofosforilasa en frijol, seis secuencias para la subunidad grande y una secuencia para la subunidad pequeña. Para verificar si estos genes se expresan en la vaina se midió su expresión mediante RT-PCR encontrando la expresión de AGPL1, AGPL2a, AGPL3b y AGPL4 de la subunidad grande y AGPS1 de la subunidad pequeña. También se midió la expresión de estos genes en la hoja de frijol y se encontró expresión de los mismos genes con excepción de AGPL4. Mediante western blot se cuantificó la abundancia de ADP-glucosa pirofosforilasa utilizando un anticuerpo específico contra la subunidad grande, encontrando que la cantidad de ADP-glucosa pirofosforilasa aumenta gradualmente conforme se desarrolla la vaina. Se midió la actividad de ADP-glucosa pirofosforilasa y se observó que la actividad es muy similar 10, 15 y 20 DDA.

Nuestros resultados muestran que los genes que codifican las subunidades de la ADP-glucosa pirofosforilasa se expresan diferencialmente, lo que sugiere la existencia de múltiples complejos. También muestran que la actividad de la enzima tiene control traduccional y postraduccional, y que no existe una relación directa con la cantidad de almidón que se acumula en la vaina de frijol.

## 2. Introducción

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa alimenticia más importante en el mundo. Este cultivo se produce en sistemas, regiones y ambientes diversos en América Latina, África, el Medio Oriente, China, Europa, EE. UU. y Canadá (Morales-Santos *et al.*, 2017). Las plantas de frijol son herbáceas, tienen hojas con tres folíolos y su crecimiento puede variar entre arbustos pequeños bien definidos, hasta plantas trepadoras. El color de sus flores es variado desde blanco a tonalidades rosas, lilas y violetas. Sus semillas, pueden tener varias formas: cilíndrica, de riñón, esféricas u otras y crecen en una vaina comestible como legumbre (ejotes, del náhuatl exotl). Como otras leguminosas, en sus raíces tienen nódulos que alojan bacterias fijadoras de nitrógeno (López *et al.*, 1985).

### 2.1 Taxonomía del frijol

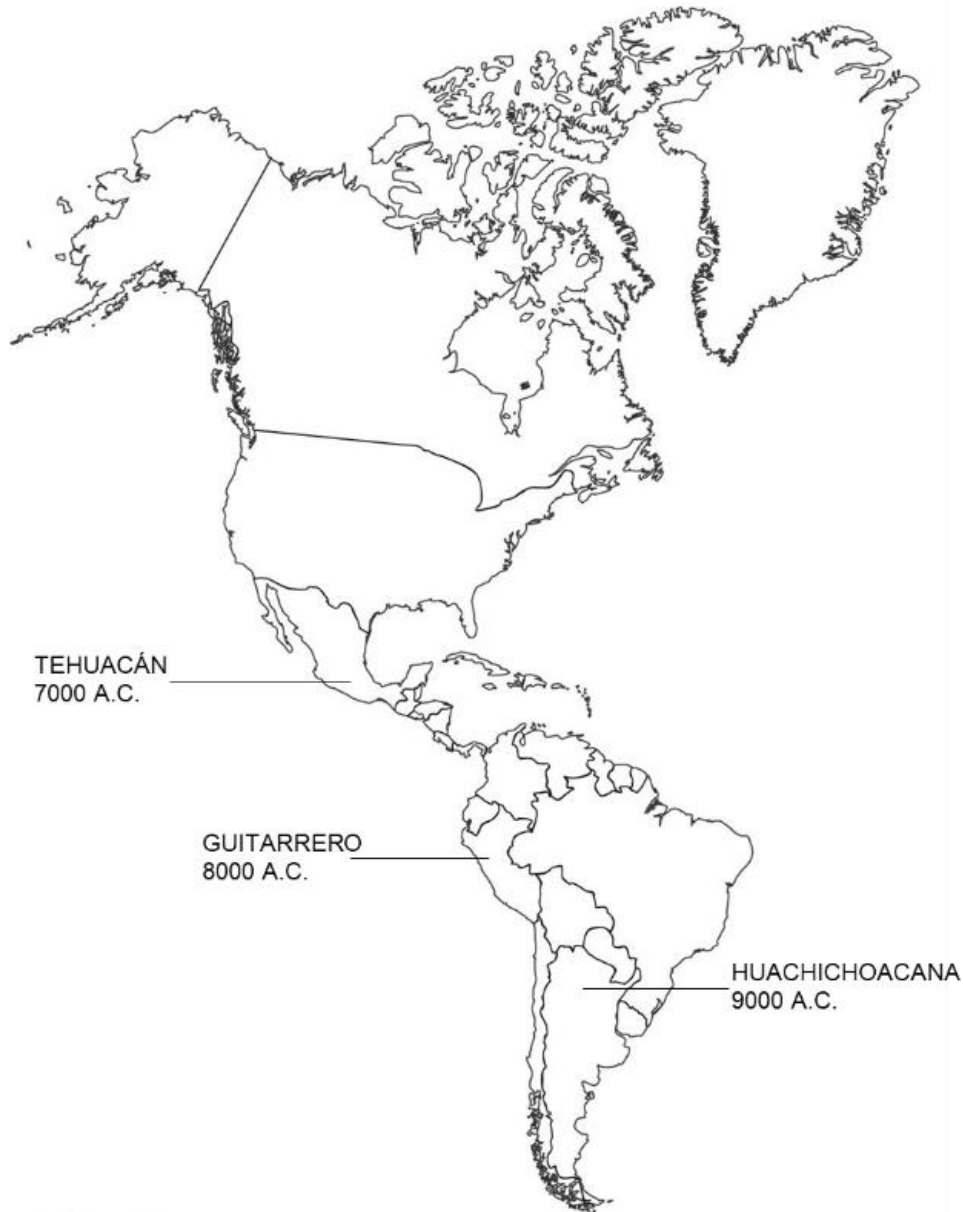
El frijol (*Phaseolus vulgaris*) pertenece al orden *Fabales*, a la familia de las *Fabaceae* (*Leguminosae*), subfamilia *Faboideae* (*Papilionoidea*), tribu *Phaseoleae*, subtribu *Phaseolinae* y al género *Phaseolus*, que incluye 55 especies, de las que se cultivan 5 (Ávila *et al.*, 2014).

Dentro de las especies cultivadas *P. vulgaris* (frijol común) es la más importante, una proporción menor de la superficie cultivada se siembra con las cuatro especies restantes (*P. lunatus* (frijol lima), *P. acutifolius* (frijol Tépari/yori muni), *P. coccineus* (frijol ayocote) y *P. dumosus* =sinom. *P. polyanthus* (Hernández *et al.*, 2013).

### 2.2 Origen del frijol

Con base en los hallazgos arqueológicos efectuados en México (Tehuacán 7000 A.C), en el norte de Argentina (Huachichoacana, 9000 A.C.) y en Perú (Guitarrero 8000 A.C.), actualmente se considera que el centro de origen de frijol es una región que comprende desde el norte de México hasta el norte de Argentina (Figura 1) (Ávila *et al.*, 2014).

Sin embargo, Hernández-López y colaboradores (2013), con base en evidencias arqueológicas, morfológico-agronómico, bioquímico y moleculares, indican que el centro de origen del frijol se ubica en la región de Mesoamérica, que comprende el occidente y sur de México (desde Jalisco hasta Oaxaca) y que hubo dos centros de domesticación, uno primario (Mesoamérica) y otro secundario (Sur Andino).



**Figura 1. Zonas arqueológicas donde se han encontrado señales del proceso de domesticación del frijol. Adaptado de Schoonhoven y Voyset (1991).**

### **2.3 Características de cultivo del frijol**

El frijol posee una amplia adaptación y se puede cultivar desde los 52° norte a los 35° latitud sur (desde Canadá hasta el norte de Argentina en el continente americano) y altitudes que van desde los 0 a los 3 000 metros sobre el nivel del mar (msnm). Las plantas de frijol también soportan un rango de temperatura (desde los 5°C hasta los 35°C); sin embargo, las condiciones óptimas para su cultivo son temperaturas entre los 18 y 25°C y precipitaciones de entre 350 y 600 mm.

### **2.4 Etapas de crecimiento del cultivo de frijol**

El cultivo de frijol consta de 2 fases de desarrollo durante su crecimiento (Figura 2) una fase vegetativa y una fase reproductiva, que a su vez se subdividen en las siguientes clasificaciones:

#### Fase vegetativa

V0 germinación: se toma como iniciación de esta etapa el día que la semilla tiene humedad suficiente para el comienzo de este proceso; es decir, el día del primer riego, o de la primera lluvia si se siembre en un suelo seco.

V1 emergencia: se inicia cuando los cotiledones de la planta aparecen a nivel del suelo.

V2 hojas primarias: comienza cuando las hojas primarias (unifoliadas) están desplegadas.

V3 primeras hojas trifoliadas: se inicia cuando la planta presenta la primera hoja trifoliada completamente abierta y las láminas de los folíolos se ubican en un plano.

V4 tercera hoja trifoliada: cuando la tercera hoja trifoliada se encuentra desplegada.

#### Fase reproductiva

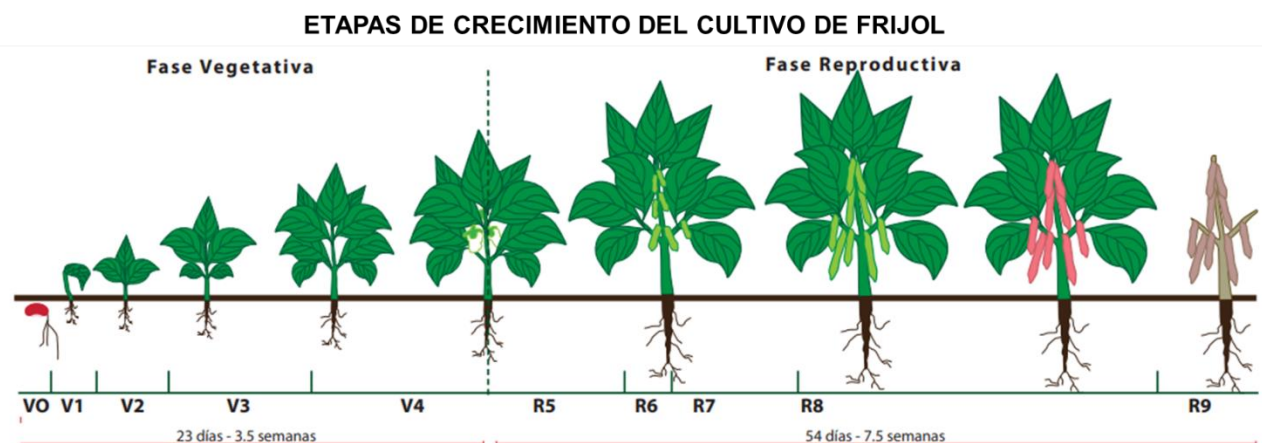
R5 prefloración: inicia cuando aparece el primer botón o racimo.

R6 floración: cuando la planta presenta la primera flor abierta.

R7 formación de las vainas: cuando la planta presenta la primera vaina con corola de la flor colgada o desprendida.

R8 llenado de la vaina: se inicia cuando la primera vaina empieza a llenar. Es el inicio del crecimiento activo de la semilla. Las vainas presentan abultados que corresponden a las semillas en crecimiento.

R9 maduración: se caracteriza por el inicio de coloración y secado en las primeras vainas, continúa el amarillamiento, la caída de hojas y todas las partes de la planta se secan; las vainas al secarse pierden su pigmentación. El contenido de agua en las semillas baja hasta alcanzar 15%, momento en el cual las semillas adquieren su color típico. Termina el ciclo biológico y el cultivo se encuentra listo para su cosecha (López *et al.*, 1985).



**Figura 2. Etapas de crecimiento del cultivo de frijol. IICA/ COSUDE (2008).**

## 2.5 Importancia nutricional del frijol

En México el frijol es uno de los principales alimentos en la dieta básica, a la que contribuye con carbohidratos y una gran cantidad de proteína, vitaminas (B, niacina, ácido fólico y tiamina), minerales (hierro, cobre, zinc, fósforo, potasio, magnesio y calcio), y fibra (Tabla 1) ([Morales et al., 2017](#)).

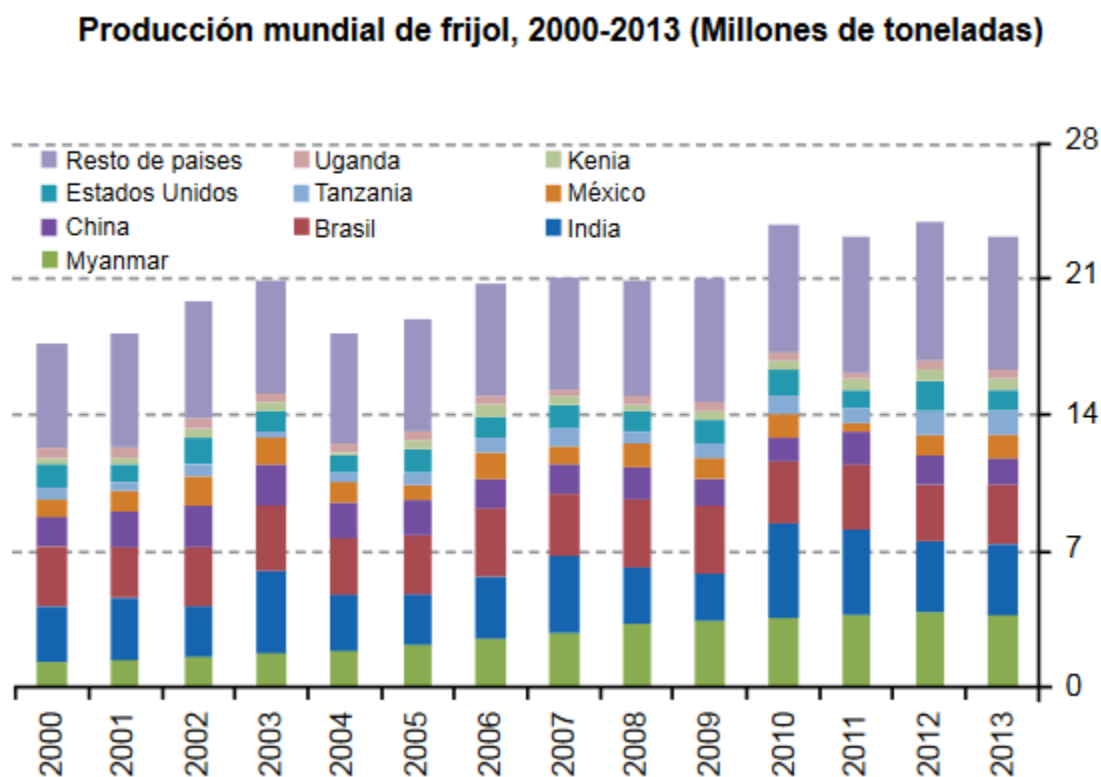
**Tabla 1. Composición nutricional del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).** Tabla basada en Wainaina et al., 2021.

Componentes	
Macrocomponentes	Microcomponentes
<p><b>Carbohidratos</b> (50% a 60%) de los cuales son:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Almidón (30% a 60%)</li> <li>• Fibra dietaria (14% a 19%)</li> <li>• Oligosacáridos (2% a 6%)</li> </ul>	<p><b>Vitaminas</b> en mg/100 g</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tiamina 0.81 a 1.32</li> <li>• Riboflavina 0.112 a 0.411</li> <li>• Niacina 0.85 a 3.21</li> <li>• Vitamina B6 0.299 a 0.659</li> <li>• Ácido fólico 0.148 a 0.676</li> </ul>
<p>Proteínas (16% a 33%)</p>	
<p><b>Lípidos</b> (1% a 3%) de los cuales son:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácidos grasos insaturados (65% a 87%)</li> <li>• Ácidos grasos saturados (10% a 15%)</li> </ul>	<p><b>Minerales</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Calcio 0.09% a 0.2%</li> <li>• Hierro 3.83 a 7.55 mg/100 g</li> <li>• Cobre 0.69 a 1.20 mg/100 g</li> <li>• Zinc 2.2 a 4.4 mg/ 100 g</li> <li>• Fósforo 0.46%</li> <li>• Potasio 1.54%</li> <li>• Magnesio 0.20%</li> </ul>

Nota: % de materia seca, a menos que se indique lo contrario.



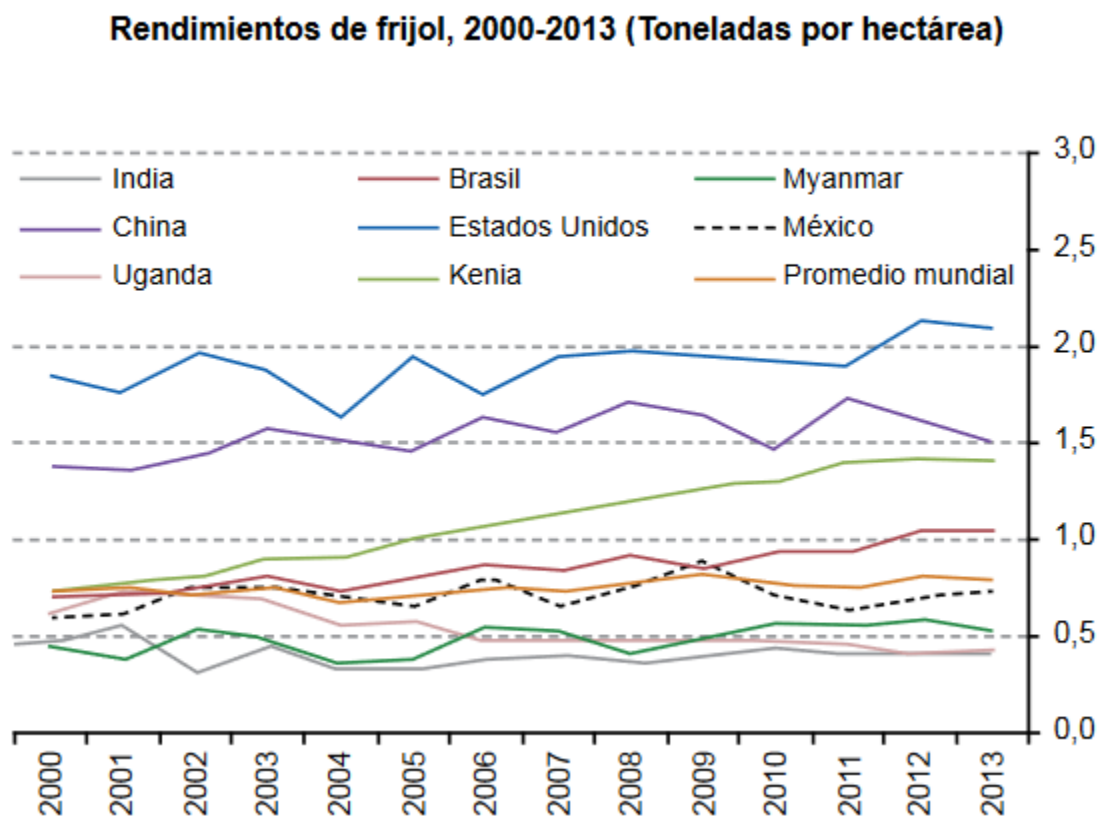
El frijol es parte fundamental de la dieta del mexicano, lo que se reconoce en el artículo 179 de la Ley de Desarrollo Rural Sustentable (LDRS), donde se le considera como un producto básico y estratégico para el país. Esta leguminosa se siembra en todas las regiones agrícolas de México. De acuerdo con datos de la FAO a nivel mundial México es el sexto productor con alrededor del 5.3% de la producción mundial en el periodo de 2000-2013. Los países con mayor producción en el periodo de 2000-2013 fueron Myanmar, India, Brasil, China, Estados Unidos y México, en ese orden. En conjunto, estos seis países aportan el 62.8 por ciento de la producción mundial de esta leguminosa (Figura 3) (Lemus *et al.*, 2015).



**Figura 3. Producción mundial de frijol, 2000-2013.** Lemus *et al.*, (2015).

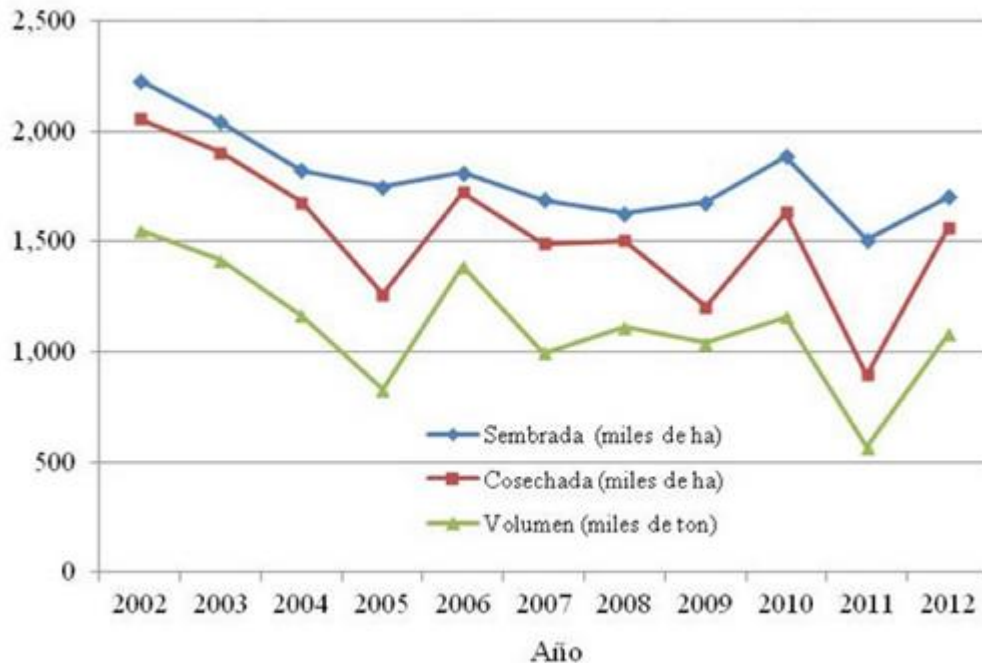
Entre los principales países productores de frijol existe diversidad en cuanto a productividad. Por un lado, Estados Unidos y China reportan productividad muy superior al promedio mundial, es decir, el rendimiento promedio fue de 2.1 y 1.5 toneladas por hectárea en 2013, respectivamente (Figura 4). Por otro lado, en India, Uganda y Kenia

apenas se alcanzan rendimientos respectivos de 0.4, 0.4 y 0.5 toneladas por hectárea (Figura 4). Los rendimientos en México se ubican alrededor del promedio mundial. Sin embargo, desde 2010 hasta 2013 el rendimiento promedio mundial ha sido consistentemente superior a los rendimientos nacionales (Lemus et al., 2015).



**Figura 4. Rendimiento de frijol, 2000-2013 (toneladas por hectárea).** Lemus et al., (2015).

Los datos anteriores no muestran las variaciones que puede experimentar la producción de frijol en cada país. En el caso específico de México en la Figura 5 se presentan los datos de producción de frijol durante el periodo 2002-2012. Estas variaciones se deben principalmente a que el 64.9% de la producción de frijol proviene de áreas de temporal, no tecnificadas y muy susceptibles a los cambios en las condiciones ambientales (Lara 2015).



**Figura 5. Superficie sembrada, cosechada y volumen de producción de frijol en México (2002-2012).** Lara (2015).

La FAO ha señalado que la demanda general de alimentos seguirá creciendo. Al mismo tiempo que el cambio climático y la competencia por los recursos naturales seguirán contribuyendo a la degradación del ambiente, con consecuencias negativas para los medios de vida y la seguridad alimentaria de las personas (Urquía 2014).

Por lo anterior es necesario explorar otras alternativas para tratar de mitigar los efectos negativos de estas situaciones. Una vertiente para abordar esta problemática es el estudio de las estrategias que las plantas de importancia alimentaria usan ante condiciones adversas que amenazan su supervivencia.

Un elemento de esa estrategia es la acumulación y degradación de almidón. Este es el carbohidrato de reserva más abundante en las plantas; se encuentra en hojas, tallos y raíces, así como en flores, frutos y semillas en los cuales se utiliza como fuente de energía durante periodos de dormancia, estrés o reinicio del crecimiento (Tofiño, 2006).

## 2.6 Vaina de fruto de frijol

La vaina (también conocida como pericarpio), es el órgano que cubre a las semillas durante su desarrollo y las protege del ataque de plagas y patógenos (Bennett *et al.*, 2011). Es una estructura fotosintéticamente activa, que tiene una capacidad de fijación de CO<sub>2</sub> del 26% respecto a las hojas (Crookston *et al.*, 1974), misma que se reduce a medida que entran en senescencia (Wagstaff *et al.*, 2009).

Estas características se complementan con la capacidad de la vaina 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. 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).

## 2.7 Desarrollo de la semilla de frijol

El desarrollo de las semillas exige una inversión muy alta de recursos metabólicos. La partición del carbono entre varios tejidos de demanda competidores es un proceso dinámico (Williams *et al.*, 2000). El desarrollo de la semilla puede dividirse en dos etapas principales, la morfogénesis y la maduración. Durante la maduración se llevan a cabo procesos vitales como el crecimiento del embrión y la acumulación de las sustancias de reserva. Para que esto ocurra es necesario que el carbono y el nitrógeno transportados se almacenen principalmente en forma de lípidos, almidón y proteínas. La sacarosa requerida para la síntesis de dichos compuestos es transportada por el floema desde las hojas fuente hasta el funículo y desde el tegumento externo hacia el interno, y de éste hacia al suspensor (Stadler *et al.*, 2005; Zúñiga-Sánchez *et al.*, 2017).

El suministro de sacarosa a la semilla es un proceso pasivo (De Jong *et al.*, 1996), la sacarosa se remueve del espacio entre la cubierta de la semilla y los cotiledones por la actividad de un simportador de H/sacarosa en las células del cotiledón (Lichtner y Spanswick, 1981). Al principio del desarrollo, la mayor parte de la sacarosa que entra en una semilla de leguminosa se convierte en hexosas. Durante la síntesis de productos de almacenamiento, la sacarosa es el azúcar principal en la semilla y en el embrión, y la síntesis de almidón y proteína se convierte en su destino principal (Weber *et al.*, 1997; Borisjuk *et al.*, 2003).

Las condiciones ambientales estresantes pueden limitar la disponibilidad de nutrientes en cualquier momento, y los azúcares (fructanos, sacarosa, glucosa y fructosa), que se acumulan como reservas en diferentes partes de la planta, se removilizan y transportan a los granos en desarrollo (Wardlaw y Willenbrink, 2000).

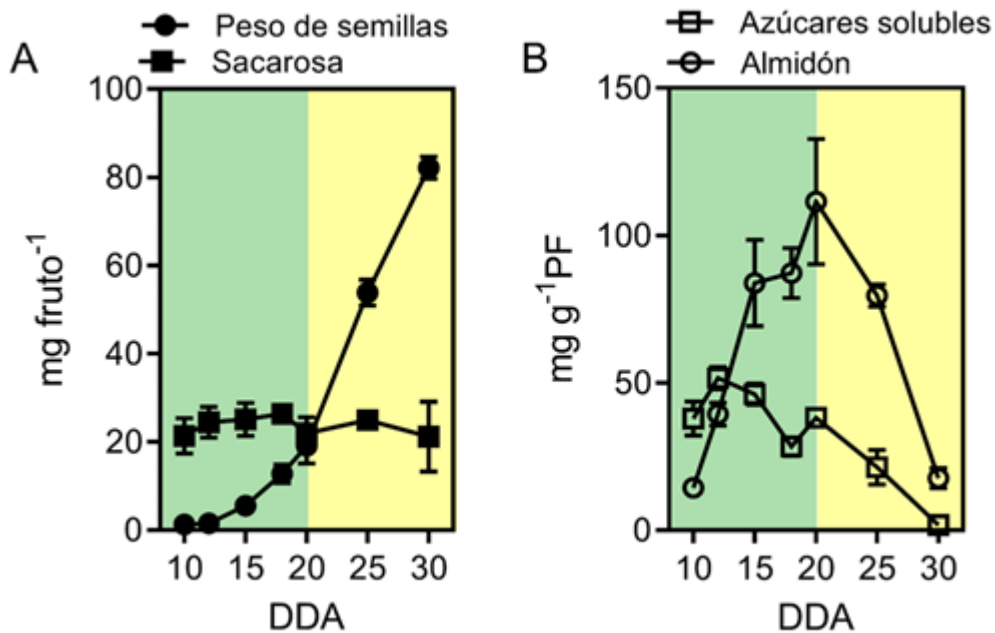
## 2.8 El almidón en vainas de fruto de frijol

En el artículo publicado por Belmont *et al.*, (2022) se describe el desarrollo del fruto de frijol en el período de 15 a 25 días después de la antesis (DAA) (Figura 6). Se observa que después de 15 DAA, el crecimiento de las semillas de frijol fue exponencial (Figura 7A). Sin embargo, la cantidad de sacarosa recibida por el fruto se mantuvo prácticamente constante durante todo el período de crecimiento de la semilla (Figura 7A).



**Figura 6. Imágenes representativas de frutos y semillas de frijol durante el desarrollo.** Belmont *et al.*, (2022).

Por otro lado, la degradación del almidón almacenado en la vaina coincide con el aumento en la velocidad de crecimiento de la semilla (Figura 7B). Estos resultados sugieren que, durante la primera parte del desarrollo de la semilla, la cantidad de sacarosa recibida por el fruto es mayor que las necesidades de las semillas en desarrollo, y que el excedente de sacarosa se almacena en la vaina como almidón o azúcares solubles, que se utilizan cuando el suministro de sacarosa ya no es suficiente para satisfacer las necesidades de las semillas.



**Figura 7. Análisis del crecimiento de semillas de frijol.** A, incremento en el peso seco de la semilla y sacarosa descargada al fruto durante un período de 24 h. B, almidón y azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) presentes en el pericarpio durante el desarrollo del fruto. Las áreas verdes y amarillas indican los períodos de acumulación y degradación del almidón, respectivamente. DDA representa días después de la antesis. Belmont *et al.*, (2022).

## 2.9 Almidón

El almidón es la forma principal en la que las plantas superiores almacenan los carbohidratos. Su presencia genera una presión osmótica insignificante, lo que permite almacenarlo en grandes cantidades sin alterar las relaciones de agua de la célula. El que se sintetiza en los cloroplastos se denomina transitorio (porque se acumula durante el período de luz y se utiliza durante la oscuridad), es muy importante para que las actividades metabólicas ocurran normalmente durante la noche. El almidón de almacenamiento se acumula en los órganos de reserva durante una fase del ciclo de vida de la planta y se utiliza en otro momento.

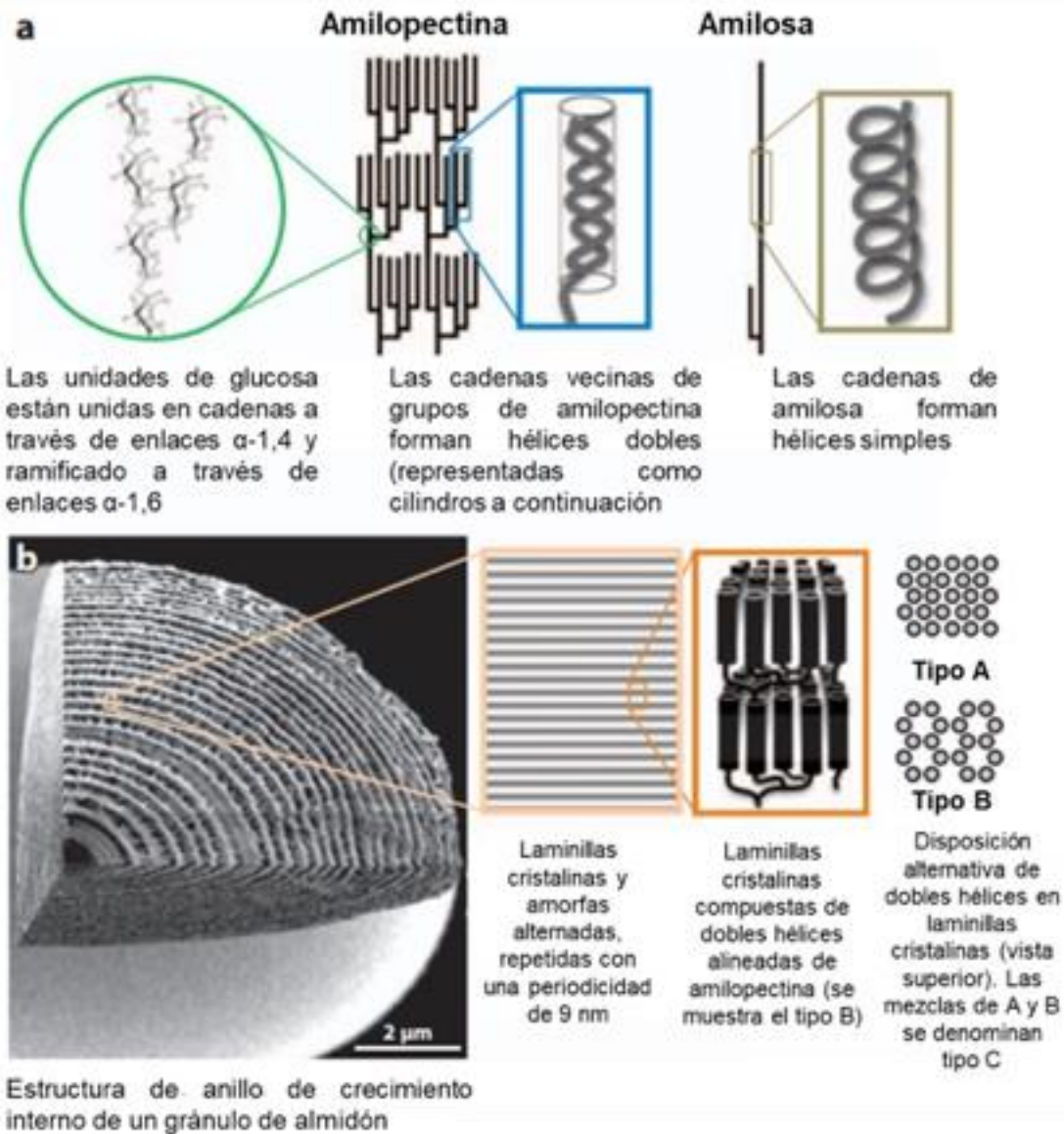
Prácticamente todos los órganos de la planta pueden sintetizar almidón; su uso eficiente podría aumentar las posibilidades de las plantas a sobrevivir a episodios de condiciones adversas. Las plantas lo producen a partir del dióxido de carbono que captan de la atmósfera y del agua que toman del suelo. La ruta para la biosíntesis de almidón involucra tres enzimas: la ADP- glucosa pirofosforilasa (AGPasa), la sintetasa de almidón (SS) y la enzima ramificadora del almidón (SBE), de las cuales existen múltiples isoenzimas que difieren en su expresión tisular y temporal, así como en sus propiedades cinéticas (Bernal y Martínez 2006).

El producto de ese proceso se organiza en gránulos semicristalinos cuya forma y tamaño dependen del origen botánico. El gránulo de almidón está conformado por dos polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina. La amilopectina es el componente principal y suele representar más del 75% de los gránulos de almidón. Es una molécula ramificada con un peso molecular estimado de 107-109 kDa. Los residuos de glucosilo que la forman están unidos por enlaces  $\alpha$ -1,4 y forman cadenas que varían en longitud de 6 a >100 residuos entre los que periódicamente aparecen enlaces  $\alpha$ -1,6 que constituyen puntos de ramificación. Aunque no se conoce su estructura molecular exacta, una combinación de la longitud de la cadena, la frecuencia de ramificación y el patrón de ramificación da como resultado una estructura en forma de “árbol” o “racemosa” en la que los grupos de cadenas aparecen a intervalos regulares a lo largo del eje de la molécula. Las ramificaciones en la amilopectina típicamente tienen en promedio de 12 a 15 residuos de

glucosilo. Las ramificaciones menos comunes tienen un promedio de 35-40 residuos. (Buleon *et al.*, 1998; Smith 2001).

Dentro de los gránulos de almidón, las moléculas de amilopectina están dispuestas radialmente, con los extremos libres (no reductores) de las cadenas mirando hacia la periferia. Se forman pares de hebras adyacentes dentro de grupos de doble hélice que se agrupan en matrices organizadas, creando capas cristalinas concéntricas (laminillas) dentro de los gránulos (Figura 8). Estas laminillas se alternan con laminillas amorfas formadas por regiones de la molécula de amilopectina que contienen puntos de ramificación. La organización laminar se repite con un período de 9 a 10 nm; esta estructura semicristalina domina la matriz de gránulos de almidón y está muy conservada en almidones de plantas superiores (Zeeman *et al.*, 2010). La amilosa, el segundo componente del almidón, es más pequeña que la amilopectina (las estimaciones del peso molecular relativo varían entre 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> kDa) y solo ligeramente ramificada. Se cree que se ubica desorganizadamente en las regiones amorfas del gránulo (Zeeman *et al.*, 2010).





**Figura 8. La composición y estructura de los gránulos de almidón.** (a) Una representación esquemática de amilosa y amilopectina, y las estructuras adoptadas por las cadenas constituyentes. (b) La relación entre el gránulo de almidón (imagen compuesta de gránulos de papa, izquierda) y la estructura de amilopectina. Las laminillas cristalinas y amorfas se organizan para formar bloques que forman los anillos de crecimiento. Modificado de Zeeman *et al.*, (2010).

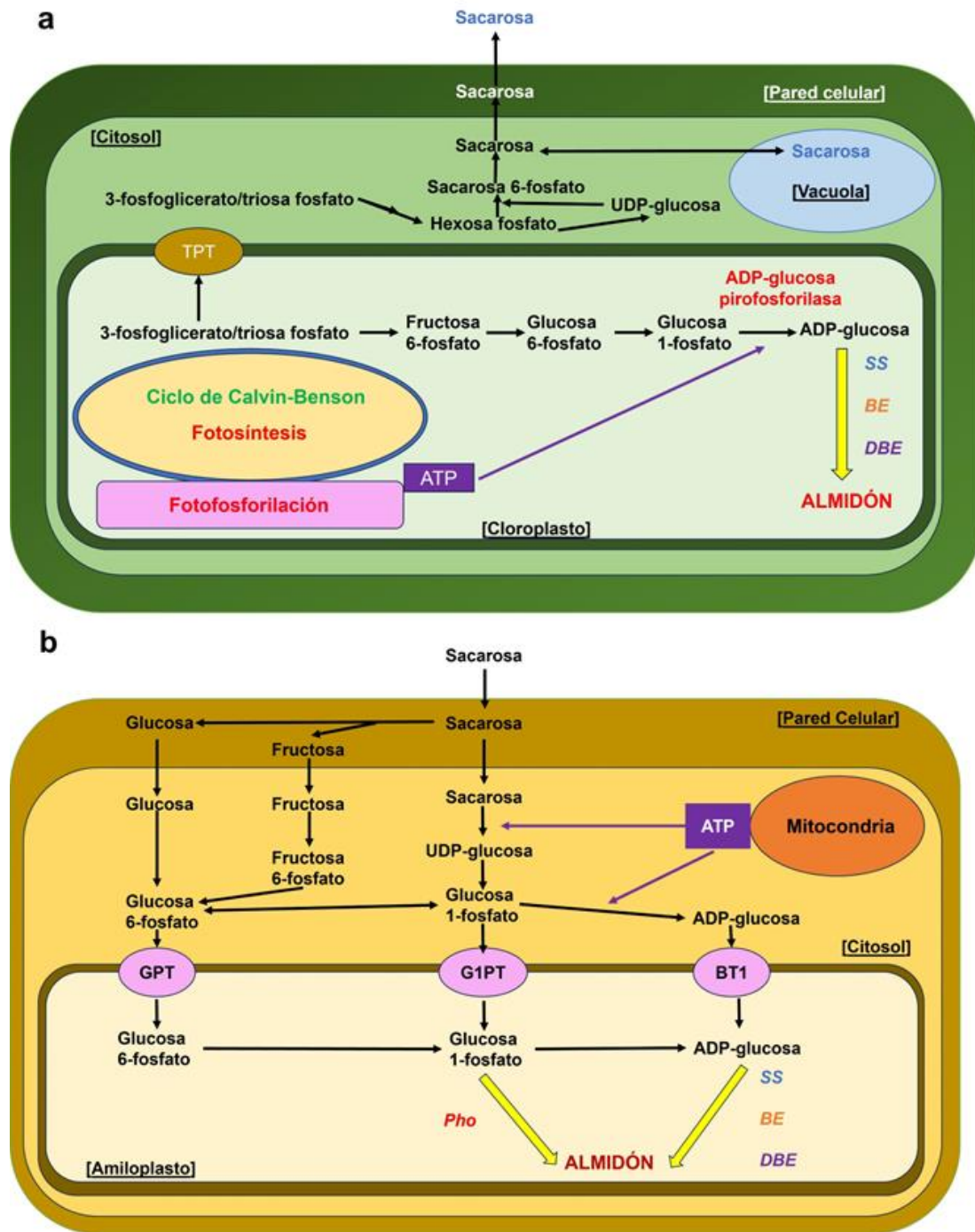
## 2.10 Síntesis del almidón

En las hojas fotosintéticas, el almidón se acumula durante el día y se remobiliza por la noche para mantener la respiración, la exportación de sacarosa y el crecimiento en la oscuridad (Geiger y Servaites, 1994). En este contexto, el almidón se ha identificado como un importante integrador en la regulación del crecimiento de las plantas para hacer frente a los cambios constantes en la disponibilidad de carbono (Sulpice *et al.*, 2009). Su importancia es evidente en fenotipos de mutantes deficientes en almidón con crecimiento anómalo o que incluso mueren en condiciones de días cortos (Caspar *et al.*, 1991). En los órganos de almacenamiento heterótrofos (Figura 9b), como los tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) o las semillas en desarrollo, el almidón sirve como almacén de carbono a largo plazo que se moviliza más tarde en el desarrollo para apoyar las fases de crecimiento reproductivo. Dado que el suministro de sacarosa a estos tejidos fluctúa, se requieren mecanismos reguladores para estimular la síntesis de almidón cuando aumenta la disponibilidad de carbono (Geigenberger *et al.*, 2004).

El carbono que se usa para la síntesis de almidón en órganos fotosintéticos es producto de la actividad del ciclo de Calvin-Benson (Nakamura, 2015). El ATP y el NADPH necesarios para la reducción del CO<sub>2</sub>, se derivan principalmente del sistema de fotofosforilación y del sistema de transporte de electrones dependiente de la luz durante la fotosíntesis. Por lo tanto, el equilibrio de fosfato inorgánico (Pi/P) total (P inorgánico más orgánico), ATP/ADP y NADPH/NADP<sup>+</sup> en cada compartimento celular (como ejemplo el cloroplasto y citosol) es esencial para mantener alta la fotosíntesis y la homeostasis en todas las células. La síntesis de almidón y sacarosa juega un papel importante en la actividad fotosintética de fijación de CO<sub>2</sub> al devolver Pi al sistema de fotofosforilación y al ciclo de Calvin-Benson. Cuando se sintetiza sacarosa en el citosol, el Pi liberado se devuelve al cloroplasto mediante el transporte de triosa-fosfato/Pi al citoplasma a través del transportador de triosa-fosfato/Pi (TPT) ubicado en la membrana del cloroplasto, como se muestra en la Figura 9a.

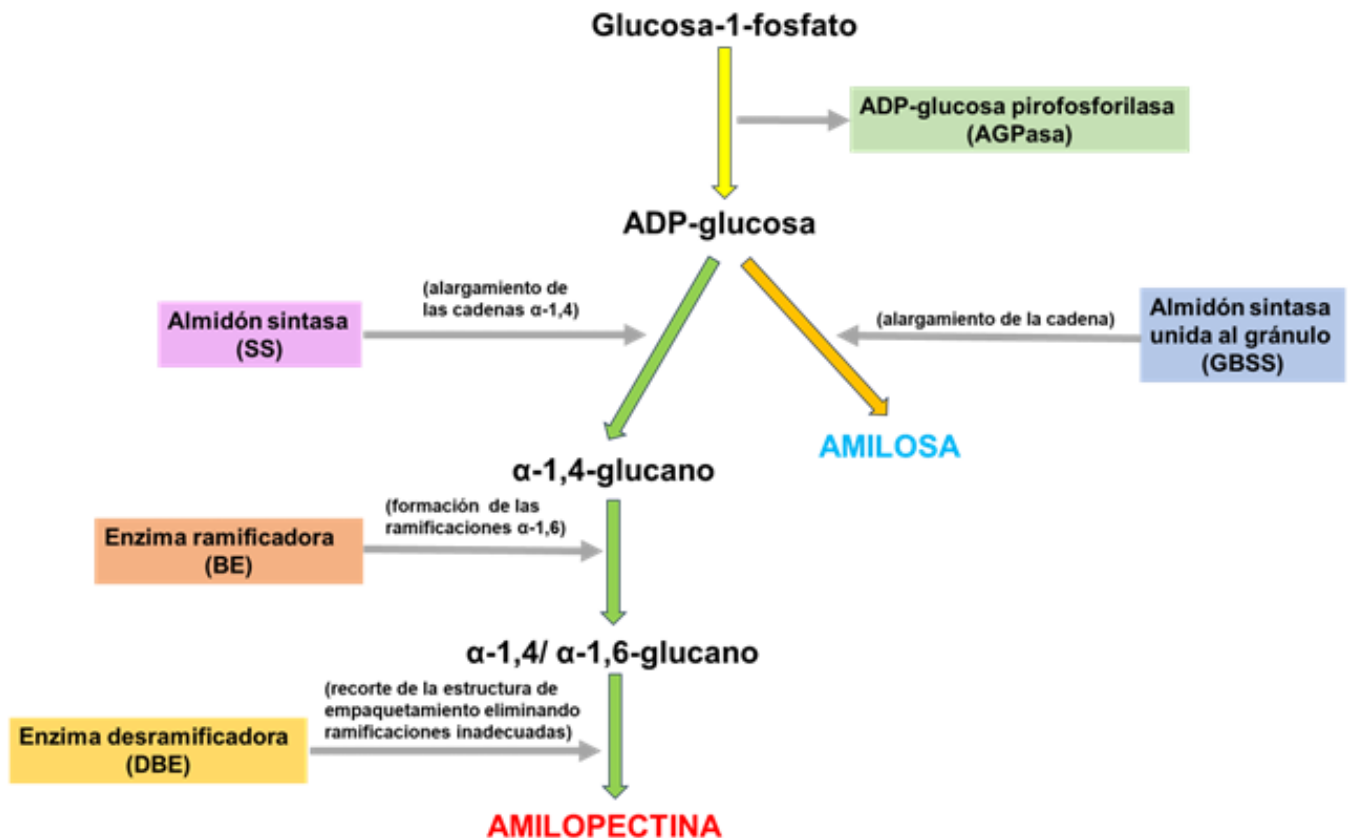
Las reacciones fotosintéticas deben ocurrir muy rápidamente para mantener todos los eventos fisiológicos y bioquímicos que requieren energía para las plantas en condiciones

de luz. Por lo tanto, el flujo de carbono desde el ciclo de Calvin-Benson hasta la síntesis de almidón y la síntesis de sacarosa es un proceso metabólico esencial en las células vegetales (Tamoi *et al.*, 2005; Nakamura 2015).



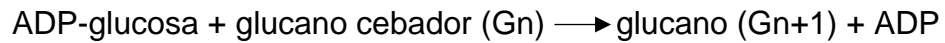
**Figura 9. Representación esquemática de la ruta de biosíntesis del almidón y el metabolismo relacionado en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos. (a) Síntesis de almidón asimilado en hojas. (b) Síntesis de almidón de reserva en los tejidos de almacenamiento. Abreviaturas: proteína BT1 Brittle-1 (transportador ADP-glucosa), translocador TPT triosa fosfato/Pi, translocador GPT G6P/Pi, transportador putativo G1P G1PT. Modificado de Nakamura (2015).**

Como se muestra en la Figura 10, el primer paso para la biosíntesis del almidón en plantas es la formación de ADP-glucosa a partir de glucosa-1-fosfato (G1P) y ATP, catalizada por la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa):



**Figura 10. Síntesis de almidón a partir de glucosa-1-fosfato.** Modificado de Nakamura (2015).

Este paso necesita ATP y libera pirofosfato inorgánico (PPi), que es metabolizado rápidamente en dos equivalentes molares de Pi por una alta actividad de la pirofosfatasa inorgánica en el estroma lo que desplaza el equilibrio de la reacción hacia la síntesis de ADP-glucosa. Posteriormente, la almidón sintasa (SS) cataliza la transferencia de la glucosa al extremo no reductor de un cebador de glucano:



Donde G denota los glucanos que tienen un número de residuos de glucosa con n y n+1, respectivamente.

Las cadenas de amilopectina son elongadas a través de la forma soluble de la enzima almidón sintasa (SS), mientras que el crecimiento de la cadena de amilosa es catalizada por la almidón sintasa unida al gránulo de almidón (GBSS, Figura 10). Los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,6 se introducen mediante enzimas ramificadoras de almidón (BE). Finalmente, las enzimas desramificadoras (DBE) eliminan las ramas innecesarias y ayudan a que la amilopectina adquiera la estructura fina que le caracteriza. Todas las enzimas participantes tienen múltiples isoformas con distintas propiedades que se ven reflejadas en la regulación del proceso (Smith 2001; Zeeman *et al.*, 2010; Nakamura 2015).

La vía de síntesis de almidón es compleja y no obstante los esfuerzos para caracterizar el papel de las enzimas involucradas y la participación de otros factores en la regulación de su actividad, aún se desconocen elementos que son importantes para definir su regulación.

## 2.11 ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa)

El análisis de control metabólico se desarrolló a principios de la década de 1970 (Kacser y Burns, 1995) y es probablemente la herramienta matemática más utilizada para estudiar el control en los procesos fisiológicos de las plantas (Ap Rees y Hill, 1994). Esta herramienta cuantifica la respuesta de una variable del sistema (por ejemplo, flujos) a pequeños cambios en los parámetros del sistema (por ejemplo, la cantidad o actividad de enzimas individuales). La contribución relativa de las enzimas al control del flujo en una ruta puede evaluarse experimentalmente estableciendo sistemáticamente una población de plantas con actividad enzimática progresivamente reducida para cada enzima en la ruta. La disponibilidad de líneas mutantes y transgénicas con expresión alterada de enzimas de la ruta de síntesis del almidón ha sido usada para establecer la contribución de cada paso al control del flujo de carbono hacia almidón (Geigenberger, 2011).

En la Figura 11 se comparan los coeficientes de control de las enzimas que participan en la síntesis de almidón en dos tipos de tejidos: fotosintéticos (Figura 11A) y no fotosintéticos (Figura 11B). En este sentido se encontró que el coeficiente de control más alto reside en la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa de tejidos fotosintéticos (Figura 11A) y en tejidos no fotosintéticos en las enzimas ADP-glucosa pirofosforilasa, PGM plastidial y translocador ADP/ATP (Figura 11B). Por lo tanto, la participación de estas enzimas en la síntesis de almidón es determinante. En este trabajo se analizó a la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa).

La enzima AGPasa es un heterotetrámero formado por dos subunidades grandes (AGPL) y dos subunidades pequeñas (AGPS) Por conveniencia, la subunidad de 50-54 kDa se denominó “pequeña” y “grande” la de 51-60 kDa; aunque la diferencia de masa entre ellas en algunos casos no es superior a 1 kDa. La subunidad pequeña en las plantas está muy conservada (85%-95% de identidad), mientras que la subunidad grande está menos conservada (50%-60% de identidad) (Ballicora et al., 2004). Se han reportado múltiples isoenzimas de AGPasa en diferentes niveles y en diferentes tejidos vegetales.

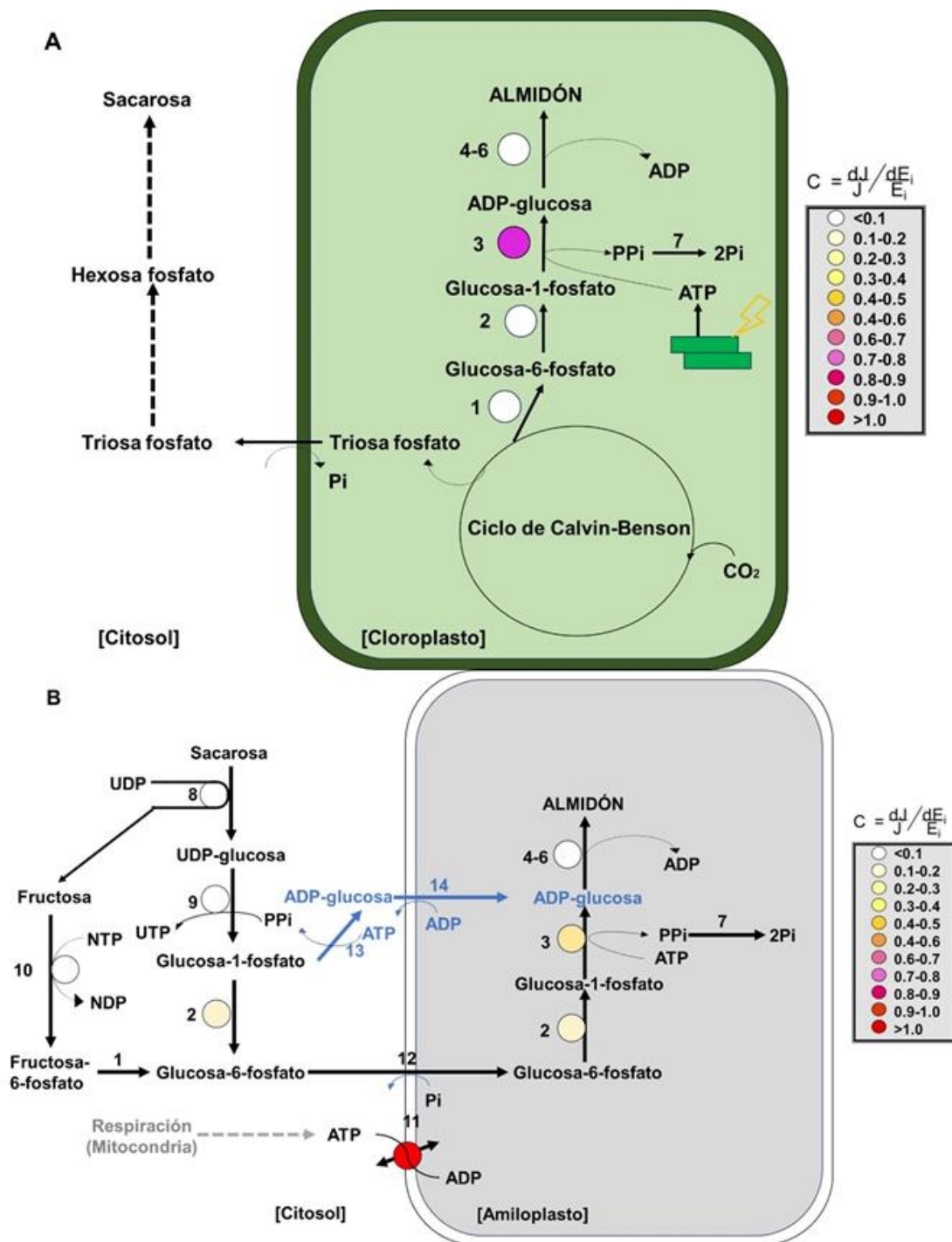
Como ejemplo, en *Arabidopsis* hay cuatro genes para la subunidad grande (APL1–APL4) y dos genes (APS1 y APS2) para la subunidad pequeña (Geigenberger, 2011).

Se ha reportado que las subunidades pequeñas tienen una función regulatoria y catalítica, mientras que las subunidades grandes son regulatorias.

En la mayoría de los tejidos, la AGPasa se encuentra exclusivamente en el plastidio. En hojas, la glucosa-1-fosfato se sintetiza a partir de intermedios del ciclo de Calvin-Benson a través de la fosfoglucoisomerasa plastídica y la fosfoglucomutasa (PGM), mientras que el ATP es proporcionado por fotofosforilación en la membrana tilacoide (Figura 11A). En tejidos no fotosintéticos como los tubérculos de papa (Figura 11B), la sacarosa entrante es convertida por una serie de reacciones citosólicas a glucosa-6-fosfato (G6P), que se importa al amiloplasto por un translocador G6P/Pi y posteriormente se convierte en glucosa-1-fosfato a través de fosfoglucomutasa plastidial. El segundo sustrato de la AGPasa, ATP, es proporcionado por la respiración mitocondrial e importado al plastidio a través del intercambiador ATP/ADP de la membrana (Geigenberger, 2011).

Por el contrario, en el endospermo de semillas de cereales, la AGPasa se encuentra principalmente en el citosol, la cual tiene una importancia mayor, ya que contribuye con alrededor del 85%-95% de la actividad (James et al., 2003). La ADP-glucosa sintetizada en el citosol debe importarse al plastidio para apoyar la síntesis de almidón.



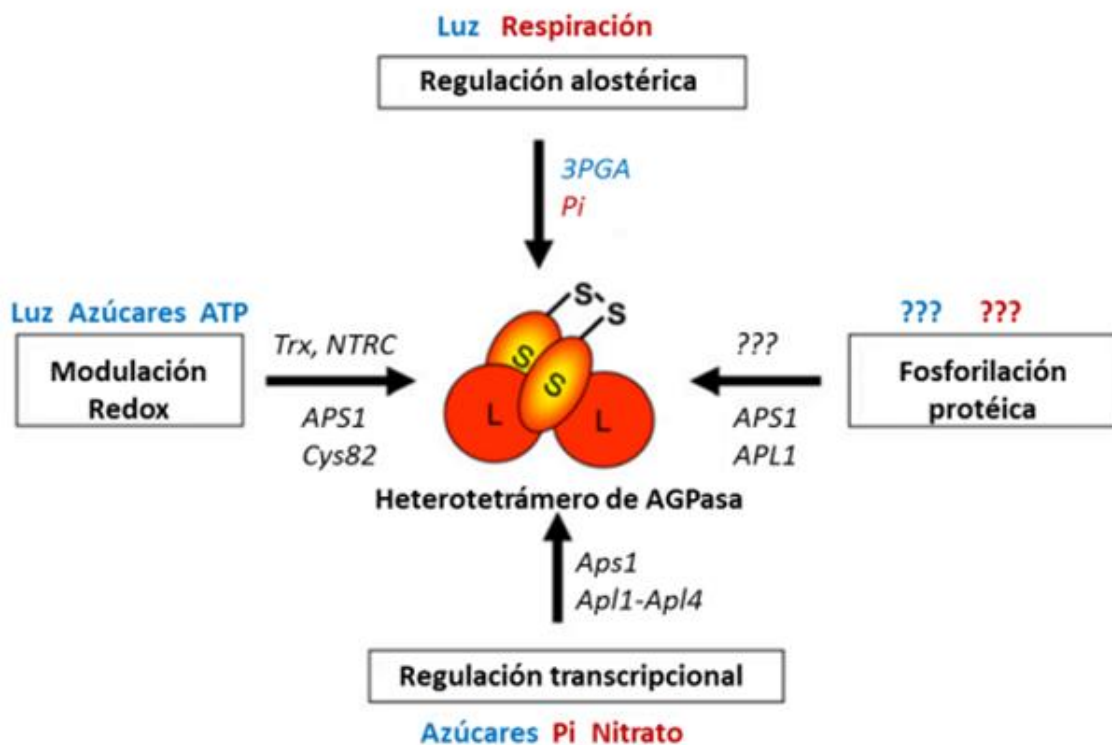


**Figura 11. Representación esquemática de la vía de biosíntesis del almidón, su compartimentación subcelular y distribución del control del flujo en hojas fotosintéticas (A) y tejidos heterótrofos (B).** Las reacciones de la vía de biosíntesis del almidón son catalizadas por las siguientes enzimas: 1, fosfoglucoisomerasa; 2, fosfoglucomutasa (PGM); 3, ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa); 4, almidón sintasa (SS); 5, enzima ramificadora de almidón (SBE); 6, enzima desramificante del almidón

(DPE); 7, pirofosfatasa inorgánica; 8, sacarosa sintasa; 9 UDP-glucosa pirofosforilasa; 10, fructoquinasa; 11, translocador ATP/ADP; 12, translocador G6P/Pi; 13, AGPasa citosólica; y 14, translocador ADP-glucosa/ADP (los pasos 13 y 14 se destacan para ser específicos para el endospermo de cereales). Los símbolos de color representan los coeficientes de control de flujo relativo (C) de las enzimas constituyentes, definidos como la relación entre el cambio fraccional en la actividad enzimática (Ei) y el flujo de almidón (J). Modificado de Geigenberger (2011).

## 2.12 Regulación de la ADP-glucosa pirofosforilasa

La regulación de la AGPasa por múltiples mecanismos (Figura 12), permite que la síntesis de almidón responda diferencialmente a una variedad de estímulos fisiológicos



y ambientales (Geigenberger, 2011).

**Figura 12. Regulación de la AGPasa plastidial por múltiples mecanismos.** La letra de color rojo indica inhibición, la letra de color azul indica activación y los signos de

interrogación indican elementos desconocidos. Abreviaturas: 3-fosfoglicerato 3PGA, fosfato inorgánico Pi, tiorredoxina Trx, NADP-tiorredoxina reductasa C NTRC, ADP-glucosa pirofosforilasa subunidad pequeña 1 de *Arabidopsis* APS1, ADP-glucosa pirofosforilasa subunidad grande 1 de *Arabidopsis* APL1. Modificado de Geigenberger (2011).

### **2.12.1 Regulación alostérica de la ADP-glucosa pirofosforilasa**

La actividad de AGPasa es afectada por las concentraciones de distintos metabolitos, destacando el efecto activador del 3-fosfoglicerato (3-PGA), mientras que el fosfato inorgánico (Pi) es un inhibidor efectivo (Figueroa *et al.*, 2022). Se ha reportado que las hexosas-fosfato (fructosa-1,6-fosfato, glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato) funcionan como activadores (Gómez-Casati e Iglesias 2002; Kuhn *et al.*, 2013), es probable que el mayor efecto sobre la actividad enzimática de las plantas dependa de la interacción entre el 3-fosfoglicerato y el fosfato inorgánico (Figueroa *et al.*, 2022). Su efecto ha sido clasificado por Ballicora *et al.*, 2004, en cuatro patrones de regulación:

- (i) Cada regulador afecta la actividad por separado (3-PGA activa la enzima al reducir la Km, aumentando la V máxima, mientras que Pi actúa como inhibidor).
- (ii) Pi sólo inhibe revirtiendo la activación de la enzima por 3-PGA.
- (iii) 3-PGA sólo activa la enzima ya inhibida por Pi.
- (iv) El efecto del 3-PGA se limita a aumentar la afinidad de la enzima por los sustratos.

### **2.12.2 Regulación redox de la ADP-glucosa pirofosforilasa**

Esta regulación implica en *A. thaliana* la formación de un enlace disulfuro reversible entre las cisteínas de la posición 82 (cys<sup>82</sup>) de las subunidades pequeñas de AGPasa y en papa de las cisteínas 12 (cys<sup>12</sup>). La forma reducida de la enzima es más sensible al 3-PGA (Ballicora *et al.*, 2000).

En hojas de guisante, papa y *Arabidopsis* se ha demostrado la importancia del estado redox sobre la actividad de la AGPasa. Sin embargo, se ha observado que el estado de dimerización también depende del nivel de azúcares solubles y de la hora del día (es decir, la enzima es más activa a la luz cuando los niveles de sacarosa son más altos) (Hendriks et al., 2003).

Michalska et al. (2009) demostraron que una NADP-tiorredoxina reductasa C (NTRC) localizada en el plastidio, que se distingue por tener un dominio de NADP-tiorredoxina reductasa (NTR) y otro de tiorredoxina (TRX) en un solo polipéptido, es capaz de activar la AGPasa *in vitro* después del suministro de NADPH. Además, los mutantes de *Arabidopsis ntrc* mostraron una disminución de la activación redox de AGPasa y niveles más bajos de almidón en los tejidos fotosintéticos (hojas) y heterótrofos (raíces).

### **2.12.3 Fosforilación de la ADP-glucosa pirofosforilasa**

En la última década, los estudios fosfoproteómicos mostraron que la AGPasa de diferentes especies y tejidos está fosforilada (Nakagami et al., 2010; Rose et al., 2012).

Recientemente, Ferrero et al. (2020) encontraron que la AGPasa del endospermo de trigo está fosforilada en la subunidad grande. En ese trabajo, los autores demostraron que la fosforilación de la enzima aumentó con el desarrollo del grano y se correlacionó positivamente con la actividad de la AGPasa y el contenido de almidón en los extractos de endospermo.

### **2.12.4 Regulación transcripcional de la ADP-glucosa pirofosforilasa**

Se ha encontrado que varios genes involucrados en la síntesis de almidón están sujetos a regulación transcripcional en diversos tejidos como las hojas de *Arabidopsis*, los tubérculos de papa y el endospermo de cereales. Gran parte de la investigación en esta área se ha centrado en la regulación transcripcional de AGPasa, porque es el primer

paso comprometido en la vía y revela un alto coeficiente de control de flujo (Figura 11A) (Geigenberger, 2011).

Existe amplia evidencia de que la expresión de los genes de la AGPasa está controlada temporal y espacialmente (Tetlow *et al.*, 2004). Los múltiples genes que codifican para las subunidades grandes muestran una fuerte especificidad en su expresión, siendo restringidos a ciertos tejidos o inducidos bajo condiciones específicas. La expresión de la AGPasa aumenta con los azúcares y disminuye con nitrato y fosfato. Esto puede permitir que la acumulación de almidón responda a los cambios en el carbono y el estado nutricional y a las limitaciones ambientales. Aunque la respuesta puede demorar varios días, este mecanismo puede aumentar la actividad de AGPasa y promover la síntesis de almidón (Blennow *et al.*, 2003; Geigenberger, 2011).

### **3. Justificación**

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que el almidón almacenado en la vaina de fruto de frijol es utilizado en la fase de desarrollo acelerado de las semillas. La actividad de AGPasa es crítica para la síntesis de almidón; sin embargo, su relevancia es diferente en distintos órganos. Creemos que, al evaluar la temporalidad de la síntesis del almidón en las vainas de fruto de frijol, podremos conocer si la actividad de la AGPasa es decisiva para determinar la cantidad de almidón que se acumula en esta estructura.

### **4. Hipótesis**

La síntesis de almidón en la vaina de los frutos de frijol está directamente correlacionada con la actividad de AGPasa.

### **5. Objetivo general**

Analizar la actividad de la enzima AGPasa en vainas de fruto de frijol de 10, 15 y 20 DDA y evaluar en qué medida depende de la cantidad de enzima y de la expresión de los genes que codifican a las subunidades que la constituyen.

### **6. Objetivos particulares**

- Realizar un análisis bioinformático de los genes que codifican las subunidades de AGPasa en frijol.
- Estudiar la expresión de los genes que codifican a las subunidades de la enzima AGPasa en vainas de fruto de frijol a los 10, 15 y 20 días después de la antesis.
- Determinar la actividad de la enzima AGPasa en vainas de fruto de frijol de 10, 15 y 20 días después de la antesis.
- Medir la cantidad de la enzima AGPasa en vainas de fruto de frijol de 10, 15 y 20 días después de la antesis.

## 7. Material y Métodos

### 7.1 Análisis bioinformático

Se realizó la búsqueda de las secuencias proteicas de las subunidades grandes (AGPL) y pequeñas (AGPS) que conforman a la enzima AGPasa en *Arabidopsis thaliana* en la base de datos The Arabidopsis Information Resource (TAIR). Posteriormente se utilizó la herramienta BLAST en la base de datos Phytozome para obtener las secuencias proteicas ortólogas en frijol (*Phaseolus vulgaris*).

También se recuperaron las secuencias de las subunidades de AGPasa de arroz (*Oryza sativa*) y papa (*Solanum tuberosum*). Se utilizó la herramienta GenomeNet Database Resources para hacer un alineamiento múltiple y un árbol filogenético de las secuencias de las subunidades de AGPasa que permitió saber si las subunidades de AGPasa de *P. vulgaris* eran grandes o pequeñas.

### 7.2 Material biológico

El estudio se realizó con frijol del genotipo G26, las semillas se desinfectaron con una solución de etanol al 70% durante un minuto y posteriormente con una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 12 minutos. Se germinaron a temperatura ambiente (23-25°C) en un recipiente con papel saturado con agua. Las plántulas se sembraron en agrolita y se regaron diariamente, turnando un día con agua y al siguiente 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.

Las flores se etiquetaron al momento en que sus órganos estuvieron totalmente expuestos (antesis) y la edad de los frutos se estableció como el número de días después de la antesis (DDA). Los frutos se recolectaron a los 10, 15, y 20 DDA, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su estudio.

### 7.3 Medición de la expresión de genes de las subunidades de AGPasa en vaina de fruto de frijol de 10, 15 y 20 DDA.

#### 7.3.1 Diseño de oligonucleótidos para PCR de las subunidades de AGPasa de frijol

Los oligonucleótidos que se utilizaron en las amplificaciones mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se diseñaron mediante el programa Primer3PLUS y se evaluaron con la herramienta Oligo Analyzer (IDT) para evitar la formación de estructuras secundarias y reducir la complementariedad entre ellos. Los oligonucleótidos que se utilizaron en la amplificación por RT-PCR se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Oligonucleótidos usados para la amplificación por RT-PCR de las subunidades de AGPasa: AGPL1, AGPL2, AGPL3, AGPL4 y AGPS1.**

Transcrito amplificado	Subunidad de AGPasa	Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido	Tamaño del producto esperado (pb)
Phvul.003G076500	AGPL1	Sentido	5'-ACAACCGTTTTGGGCCTTTC-3'	128
		Antisentido	5'-TCGTTTGCAGTTGGAAAGCG-3'	
Phvul.009G059800	AGPL2a	Sentido	5'-TGGAATTCCACGTGCTGTTC-3'	145
		Antisentido	5'-AAAAAGGCGAGTTCCTGCAC-3'	
Phvul.011G044000	AGPL3a	Sentido	5'-GGTGTCTGCTTGTGTAACCT-3'	181
		Antisentido	5'-AGGAGAGGGTGAAGAAGGCA-3'	
Phvul.001G219900	AGPL4	Sentido	5'-TTGGCTGCAACTCAAACACC-3'	99
		Antisentido	5'-ATCAGCGTCCTCAAACAACC-3'	
Phvul.009G023100	AGPL3b	Sentido	5'-TGCTCACTTGGCAAACCTCAG-3'	99
		Antisentido	5'-ACAAAGGCACTGTTGTTGGG-3'	
Phvul.001G012500	AGPL2b	Sentido	5'-TGCATCAACAGTGGCATCAG-3'	119
		Antisentido	5'-AAACCGCCTCCAAAGTTCAC-3'	
Phvul.008G284000	AGPS1	Sentido	5'-TATCACTGTTGCTGCCTTGC-3'	105
		Antisentido	5'-TTGGGCTTTTCGGCGAATTC-3'	

Nota: AGPL corresponde a la subunidad grande de AGPasa y AGPS corresponde a la subunidad pequeña de AGPasa.



### 7.3.2 Extracción de RNA

La extracción de RNA total del tejido de vainas de fruto de frijol de 10, 15 y 20 DDA se realizó con el método de tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo usando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El reactivo TRIzol es una solución monofásica de isotiocianato de fenol y guanidina diseñada para aislar fracciones separadas de RNA, DNA y proteínas de muestras de células y tejidos. El procedimiento consiste en la lisis de la muestra con el reactivo TRIzol. La adición de cloroformo promueve que el lisado se separe en una capa clara acuosa en la parte superior (que contiene RNA) y en la parte inferior una capa orgánica de color rojo y otra de interfase (que contienen DNA y proteínas). Se colecta la capa acuosa y el RNA se precipita con isopropanol.

Las vainas (400-500 mg) que estaban almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , se molieron con nitrógeno líquido en un mortero estéril frío. El tejido molido se resuspendió en 2.5 mL de TRIzol (Thermo Fisher) en un tubo de centrifuga estéril. Se incubó 5 min a temperatura ambiente y se le agregaron 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo, se mezcló, se mantuvo a temperatura ambiente por 3 min y se centrifugó a  $12,000 \times g$  por 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . La fase acuosa se colectó, y se añadieron 1.5 mL de isopropanol para precipitar el RNA. Se incubó la muestra 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después se centrifugó a  $12,000 \times g$  durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se desechó y la pastilla se lavó con 2.5 mL de etanol al 75% v/v, se centrifugó 5 min a  $12,000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se decantó el etanol y la pastilla se dejó secar al aire por 5 min, después se resuspendió en 25  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de RNasas. El RNA se cuantificó en el espectrofotómetro BioDrop (Biochrom) y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Obtenido el RNA se realizó la remoción de DNA genómico presente en las muestras utilizando NZY DNasa I (NZYTech) de acuerdo con el manual del fabricante. El procedimiento seguido consistió en mezclar 16  $\mu\text{L}$  RNA, 2  $\mu\text{L}$  Buffer 10X [Tris-HCl 100 mM pH 7.6,  $\text{MgCl}_2$  25 mM,  $\text{CaCl}_2$  5 mM], 1  $\mu\text{L}$  NZY DNasa I y 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasas. Se incubó durante 10 min a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5 min a  $58^{\circ}\text{C}$  para inactivar la DNasa. La integridad del RNA y la efectividad del procedimiento se evaluó en un gel de agarosa al

2% [Agarosa 2 % p/v en 30 mL de amortiguador TAE (Tris-acetato-EDTA) y 6.0 µL de GelStar Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Scientific)].

### **7.3.3 Síntesis de cDNA (transcripción inversa)**

La retrotranscriptasa es una enzima que tiene como función sintetizar una molécula de doble cadena de DNA a partir de una molécula de cadena sencilla de RNA. La síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó utilizando el sistema Readyscript cDNA Synthesis Mix (Sigma-Aldrich) de acuerdo con el manual del fabricante. Se realizó la reacción con 4 µL de la mezcla Readyscript cDNA Synthesis, 3 µL de RNA de vaina de 10, 15 y 20 DDA y 13 µL de H<sub>2</sub>O sumando un volumen total de 20 µL. La reacción se realizó en las siguientes condiciones: 5 min a 25°C, 30 min a 42°C y 5 min a 85°C. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C.

### **7.3.4 PCR**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) permite amplificar *in vitro* millones de veces una secuencia de DNA delimitada por cebadores específicos, usando para ello una enzima DNA polimerasa termoestable.

Para el PCR se utilizó el kit DreamTaq™ Hot Start PCR Master Mix (Thermo Fisher). La reacción se realizó mezclando 5 µL de Dream Taq Hot Start, 0.5 µL de los oligonucleótidos sentido y antisentido, 2 µL de cDNA y 2 µL H<sub>2</sub>O libre de DNasas. Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: 95°C 3 min, 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1 min, por 30 ciclos de proceso de amplificación (Equipo T100 Thermal Cycler BioRad). Como control positivo se usaron oligonucleótidos para la amplificación de actina y como control negativo una reacción en la que se omitieron los oligonucleótidos. Los

productos de la PCR se corrieron en un gel de agarosa 1.5 % [Agarosa 1.5% en 30 mL de amortiguador TAE y 4  $\mu$ L de GelStar Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Scientific)].

## **7.4 Análisis de la enzima AGPasa en vainas de fruto de frijol de 10, 15 y 20 DDA**

### **7.4.1 Extracción de Proteínas**

Para la extracción de proteínas de las vainas de frutos de frijol de 10, 15 y 20 DDA se preparó la solución amortiguadora de extracción (SAE): [Hepes 50 mM (pH 7.5);  $MgCl_2$  5 mM; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; DTT 2 mM; Glicerol 10 % v/v; Tritón X-100 0.1% v/v; Polivinilpirrolidona (PVPP) 33 mg/mL; Inhibidor de proteasas Complete 1 tableta]. El tejido se molió en un mortero con SAE en relación 1:5 (1 g de tejido en 5 mL de SAE), después se centrifugó a 12,000 x *g*/10 min a 4°C. Al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio para llevarlo al 70%. Se mezcló y se mantuvo a 4°C por 60 min. Se centrifugó a 12, 000 x *g* por 15 min a 4°C. La pastilla obtenida se resuspendió en 1 mL de SAE sin PVPP y se centrifugó a 12, 000 x *g* por 1 min. La muestra se desaló en una columna de Sephadex G25 previamente equilibrada (15 mL de SAE sin inhibidor de proteasas y PVPP). La columna se cargó con 1 mL de extracto, después se agregó 1 mL de SAE que no se colectó y la proteína se recuperó con 3 mL de SAE que se agregaron después.

### **7.4.2 Cuantificación de Proteínas**

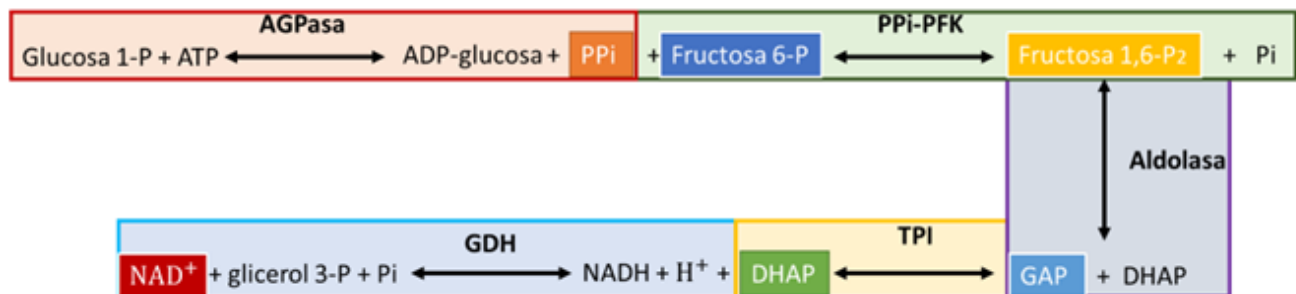
La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976) en placas de 96 pozos. Se colocaron 2  $\mu$ L de muestra, 18  $\mu$ L de agua y 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford. Se realizó la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en el espectrofotómetro de placa MULTISKAN FC (Thermo Scientific). Los valores se

interpolaron en una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de 0 a 10  $\mu\text{g}$  de proteína.

### 7.4.3 Medición de la actividad de la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa)

El seguimiento de una reacción catalizada por una enzima requiere medir la disminución de sustrato o el aumento de producto utilizando métodos espectrofotométricos o fluorimetría. En este caso, para la medición de la actividad de AGPasa se utilizó un conjunto de enzimas que permiten medir la cantidad de PPI que se genera cuando la G1P se convierte en ADP-glucosa a partir del consumo de NADH (Figura 13).

Para ello 100  $\mu\text{L}$  de extracto (300  $\mu\text{g}$  de proteína total) se mezclaron con 25  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción 5X [Hepes 250 mM pH 7.5;  $\text{MgCl}_2$  75 mM; ATP 20 mM; G1P 20 mM; 3PGA 25 mM; DTT 25mM; BSA 25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ]. Se incubó a 37°C por 30 min. La reacción se detuvo calentando a ebullición por 2 minutos. El PPI liberado se cuantificó agregando 150  $\mu\text{L}$  de "Pyrophosphate reagent" (Cat # 7275 Sigma-Aldrich) que contiene: Imidazol x HCl 45 mM pH 7.4; citrato 5 mM; EDTA 0.10 mM;  $\text{Mg}^{2+}$  2 mM;  $\text{Mn}^{2+}$  0.2 mM;  $\text{Co}^{2+}$  0.02 mM;  $\beta$ -NADH 0.8 mM; Fructosa-6-fosfato 12 mM; BSA 5 mg/mL; PPI-PFK 0.5 unidades/mL; aldolasa 7.5 unidades/mL; GDH 5 unidades/mL; TPI 50 unidades/mL. Después de una incubación de 40 minutos a 30°C se midió la absorbancia a 340 nm. Los resultados se interpolaron a una curva patrón de PPI (0 a 0.025  $\mu\text{mol}$ ).



**Figura 13. Esquema de las reacciones enzimáticas de la medición de actividad AGPasa.** Abreviaturas: (Glucosa 1-P) glucosa-1 fosfato, (ATP) adenosín trifosfato, (AGPasa) ADP-glucosa pirofosforilasa, (PPI) pirofosfato, (Fructosa 6-P) fructosa 6

fosfato, (PPi-PFK) fosfofructocinasa dependiente de PPI, (Fructosa-1,6-P<sub>2</sub>) fructosa 1,6 difosfato, (Pi) fosfato inorgánico, (GAP) gliceraldehído-3-fosfato, (DHAP) dehidroxicetona fosfato, (TPI) triosa fosfato isomerasa, (GDH) glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, (NADH) nicotin adenin dinucleótido (abreviado NAD<sup>+</sup> en su forma oxidada y NADH en su forma reducida).

#### **7.4.4 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)**

Las muestras de extracto proteico de vainas de 10,15 y 20 DDA se mezclaron con la solución amortiguadora de carga 3X [Tris-HCl 180 mM (pH 6.8), SDS (dodecil sulfato sódico) 6%, glicerol 30%, 2-mercaptoetanol 15% y azul de bromofenol 3 mg/mL] y se calentaron a 85°C por 5 min, se cargaron 10 µg de proteína de cada muestra en el gel apilador.

La electroforesis se realizó a 100 V hasta que el frente de corrida alcanzó el borde del gel. Una vez terminada la electroforesis, el gel se tiñó con azul de Coomassie coloidal y se mantuvo en agitación constante durante 12 h. Terminado el tiempo, el gel se destiñó con la solución de desteñido [etanol 10 % (v/v) y ácido ortofosfórico 2 % (v/v)], la imagen se obtuvo utilizando el equipo ChemiDoc (Bio-Rad).

#### **7.4.5 Inmunodetección de la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa)**

El método se fundamenta en la transferencia e inmovilización de las proteínas sobre una membrana (nitrocelulosa, PVDF, etc.), previa separación por una electroforesis SDS-PAGE. Una vez inmovilizadas las proteínas, se usa un anticuerpo primario específico de la proteína de interés, y un anticuerpo secundario que reconoce a las inmunoglobulinas de la especie en la que se ha obtenido el anticuerpo primario. El anticuerpo secundario está conjugado con una enzima que al reaccionar con su sustrato genera una señal que

puede ser cuantificada. Este procedimiento se denomina western-blot. En nuestro caso para la detección de la enzima AGPasa en los extractos de vainas de fruto de frijol de 10, 15 y 20 DDA, se utilizó un anticuerpo específico para la subunidad grande de la enzima AGPasa utilizada anteriormente (Belmont *et al.*, 2022).

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) durante 1 h a 100 V en solución de transferencia [Tris-HCl 12.5 mM, glicina 96 mM, metanol 20%, SDS al 20%, pH 8.3]. Terminada la transferencia, la membrana se incubó en una solución de leche descremada al 5% p/v en TBS-T [Tris-Base 20 mM pH 7.5; NaCl 150 mM; Tween-20 0.1%] por 1 h a temperatura ambiente con agitación constante. Se adicionó el anticuerpo primario anti AGPasa-LS (GenScript, dilución 1:20,000) y la membrana se incubó por 12 h a 4°C con agitación constante. Al día siguiente, se hicieron 4 lavados de 15 min con solución amortiguadora TBS-T [Tris-Base 20 mM pH 7.5; NaCl 150 mM; Tween-20 0.1%]. Después la membrana se incubó con el anticuerpo secundario diluido 1:20000 en amortiguador TBS-T por una 1 h a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente se hicieron 4 lavados de 15 min cada uno con TBS-T, y la membrana se reveló utilizando el sustrato Immobilon Western HRP (Millipore), la señal se visualizó en el foto documentador Chemidoc (BIORAD).

## 8. Resultados

La enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa) tiene un papel clave en el metabolismo de síntesis de almidón (Geigenberger, 2011). Con la finalidad de investigar si su actividad determina la cantidad de almidón que se acumula en las vainas de fruto de frijol, se planteó su estudio que aborda los siguientes aspectos:

- Análisis bioinformático de los genes que codifican a las subunidades de AGPasa
- Estudio de sus niveles de expresión
- Cuantificación de la cantidad proteína
- Medición de la actividad enzimática

### 8.1 Análisis bioinformático de los genes que codifican a las subunidades de AGPasa

Las secuencias de aminoácidos de las subunidades de AGPasa en *Arabidopsis thaliana* se obtuvieron de la base de datos TAIR: 2 para la subunidad pequeña (AGPS1 y AGPS2) y 4 para la subunidad grande (AGPL1, AGPL2, AGPL3 y AGPL4) (Tabla 3).

**Tabla 3. Subunidades pequeñas y grandes de ADP-glucosa pirofosforilasa en *Arabidopsis***

Subunidad	Abreviatura	Identificador	Número de aminoácidos
ADP-glucosa pirofosforilasa pequeña 1	AGPS1	AT5G48300	521
ADP-glucosa pirofosforilasa pequeña 2	AGPS2	AT1G05610	477
ADP-glucosa pirofosforilasa grande 1	AGPL1	AT5G19220	523
ADP-glucosa pirofosforilasa grande 2	AGPL2	AT1G27680	519
ADP-glucosa pirofosforilasa grande 3	AGPL3	AT4G39210	522
ADP-glucosa pirofosforilasa grande 4	AGPL4	AT2G21590	524

Posteriormente, esa información se usó para realizar la búsqueda de las secuencias en frijol utilizando la herramienta BLAST de la base de datos de Phytozome, obteniendo como resultado una secuencia para subunidad pequeña (AGPS) y seis secuencias para la subunidad grande (AGPL) como se muestra en la Tabla 4:

**Tabla 4. Subunidades de la ADP-glucosa pirofosforilasa en frijol.**

<b>Subunidad</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Identificador</b>	<b>Número de aminoácidos</b>
ADP-glucosa pirofosforilasa pequeña	AGPS	Phvul.008G284000	516
ADP-glucosa pirofosforilasa grande	AGPL	Phvul.003G076500	522
ADP-glucosa pirofosforilasa grande	AGPL	Phvul.009G059800	529
ADP-glucosa pirofosforilasa grande	AGPL	Phvul.001G012500	521
ADP-glucosa pirofosforilasa grande	AGPL	Phvul.011G044000	529
ADP-glucosa pirofosforilasa grande	AGPL	Phvul.009G023100	526
ADP-glucosa pirofosforilasa grande	AGPL	Phvul.001G219900	532

También se obtuvieron las secuencias de arroz (*Oryza sativa*), las cuales incluyen dos para la subunidad pequeña (AGPS1 y AGPS2) y cuatro para la subunidad grande (AGPL1, AGPL2, AGPL3 y AGPL4) (Tabla 5).



**Tabla 5. Subunidades pequeñas y grandes de ADP-glucosa pirofosforilasa en arroz.**

<b>Subunidad</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Identificador</b>	<b>Número de aminoácidos</b>
ADP-glucosa pirofosforilasa pequeña 1	AGPS1	LOC_Os09g12660	501
ADP-glucosa pirofosforilasa pequeña 2	AGPS2	LOC_Os08g25734	515
ADP-glucosa pirofosforilasa grande 1	AGPL1	LOC_Os03g52460	512
ADP-glucosa pirofosforilasa grande 2	AGPL2	LOC_Os01g44220	519
ADP-glucosa pirofosforilasa grande 3	AGPL3	LOC_Os05g50380	520
ADP-glucosa pirofosforilasa grande 4	AGPL4	LOC_Os07g13980	510

Se realizó el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las subunidades de AGPasa ya reportadas de *Arabidopsis* y arroz con las de frijol, para poder identificar que subunidad de AGPasa de frijol presentaba homología y poder clasificarlo.

A continuación, se presenta el alineamiento:

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

AT5G48300.1      -----MASVSAIGVLKVPASTSNSTGKATEAVPTRL SFSSSVTSSDDKISLKSTV
Phvu1.008G284000 -----MASMASIGSLNVPSSSSSSSNGGRKILPRALSFSASQLYG-----DKISTD
LOC_0s09g12660.1 -----MAMMAMGAASWAPIPAPARAAA AFYPGRDLAAARRRR-----
LOC_0s08g25734.1 -----MAMAAAAMGVASPYHAAHAAASTSCDSLRL LVAEGRPRRPRGVASSS
AT5G19220.1      -----MVVSADCRISLSAPSCIRSSSTGLTRHIKLG SFCNGELMGKKNLSQLPNIRL
Phvu1.003G076500 -----MAASAVGQITVSSVQLHGMGCGRNWKLVKFC NGELMGRKVQLKTGASRSA
LOC_0s03g52460.1 -----MAAMDRLVAAPASVAAAARCGTSLARPWPAR AVGGGGGGGRRRLSVR----
AT4G39210.1      --MDSCCNFSLG-TKTVLAKDSFKNVENKFLGEEKI G-SVLKPFSSDLSSKKFRNR----
AT2G21590.1      --MDSSYSFALGTSSSILPKLSFRNVENRFYGEKN NNNGLCKRFGSDLGSKKFRNQ----
Phvu1.011G044000 -MVSACVTLKANATHYGNLRKDNTRFRQDGGFLGD RIKGSLSPWIIINQLALSLRTQERVK
Phvu1.009G023100 -MASSSVTLKANAHLANSEKGHLEFRQESSFLGER VKVGPNNSAFVTNQLARCSRSQKRVN
LOC_0s01g44220.1 --MQFMMPLDTNACAQPMRRRAGEGAGTERLMERL NIGGMTQEKALRKRCFGDGVGT----
LOC_0s05g50380.1 MQFSSVFPLEGGKACVSPIRRGEGGSASDRLKIG DSSSIKHDRAVRRMCLGYRGTKN----
Phvu1.009G059800 ---MESTCATLSGILAKVSEGTGRNRRSGFWGESTR GSGNTRFLSVQSKTSQTSKNLRN
Phvu1.001G012500 --MEASIAATPGAGGIVATKGFGTRSRGSGFWGENT RGS LNVRFHSTQPKSVKARS----
AT1G27680.1      -MESCFPAMKLNQCTFGLNNEIVSERVSFAWGTQV VKNHLRTTKLRSAPQKKIQTN---
LOC_0s07g13980.1 --MATCSWAATTAAPPPARCSRVAALRRTAAASAA AASCVLAEAPKG-----
Phvu1.001G219900 -MMVASELQGLSMPLGTTKPAFHHDKNLSSSFSCS RVNLLQSKNVVSGFPSGKFFSVVTR
AT1G05610.1      -----MQISSSSFITKFTNLHMVVRSTSDHHQWR HNYNLKQLFIPNLSVS-----

AT5G48300.1      SRLCKSVVRRNPIIVSPKAVSDSQNSQTC LDPDASSSVLGIILGGGAGTRL YPLTKKRAK
Phvu1.008G284000 SVSVAPKRVRNPVVVSPKAVSDSQNSQTC LDPDASKSVLGIILGGGAGTRL YPLTKKRAK
LOC_0s09g12660.1 -----GAAARRPFVFTPRAVSDSRSSQTC LDPDASTSVLGIILGGGAGTRL YPLTKKRAK
LOC_0s08g25734.1 SSSSSAGRRRRPLVFS PRAVSDSKSSQTC LDPDASTSVLGIILGGGAGTRL YPLTKKRAK
AT5G19220.1      RSSTNFSQKRILMSLNS-VAGESKVQELETEKRD PRTVASIILGGGAGTRLFPLTKRRAK
Phvu1.003G076500 YTKNVKQHRICMSLTADLSTESKLRDLEMERRN ARTVLAIVLGGGAGTRLFPLTKRRAK
LOC_0s03g52460.1 -----TSVATTEAAAAAVGASEDAALEARD SKTVVAVILGGGAGTRLFPLTKRRAK
AT4G39210.1      KLRPGVAYAIATSKNAKEALK-NQPSMFERRR ADPKNVAAIILGGGDGAKLFPLTKRAAT
AT2G21590.1      KFKHGVVYAVATSDNPKKAMT-VKTSMFERRK VDPQNVAAIILGGGNGAKLFPLTMRAAT
Phvu1.011G044000 KAKPGVVS AVLTSSTTKESVD-FQIPAF LRRKANPKNVVSIILGGGPGIQLFPLTKRAAT
Phvu1.009G023100 ---HGVASAILTSNDAKESLS-LQVPSFMRRR VDPKNVSIILGGGPGKQLFPLTQRAAT
LOC_0s01g44220.1 -----TARCVFTSDADRDPH-LRTQSSRKNY ADASHVSAVILGGGTGVQLFPLTSTRAT
LOC_0s05g50380.1 -----GAQCVLTS DAGPDLH-VRT-SFRRNFAD PNEVAIVLGGGTGTQLFPLTSTRAT
Phvu1.009G059800 SKPPGIPRAVLTSDINEDSMAYQGVPTFQTTE VNPKSVASIILGGGAGTRLFPLTGRRAK
Phvu1.001G012500 -SNSGIAYAVYTPDINTE-----SPRSIIQ SPKTNPENVAIILGGGAGTPLFPLTSTRAK
AT1G27680.1      -----LIRSVLTPFVDQE-----SHEPLL RTQNADPKNVASIILGGGAGTRLFPLTSKRAK
LOC_0s07g13980.1 -----LKVEQADAVEPAAAAAARRDVGPD TVASIILGGGAGTRLFPLTRTRAK
Phvu1.001G219900 RKTTRRFLAMSTLADVANDFMALQSPILTG REANPKTVASIILGGGAGTRLFPLTQRRAK
AT1G05610.1      -----NSQHLPLNQSVAAIVFGGGS DSELYPLTKTRSK
* .:::*** . *::** ..

```

AT5G48300.1  
Phvu1.008G284000  
LOC\_Os09g12660.1  
LOC\_Os08g25734.1  
AT5G19220.1  
Phvu1.003G076500  
LOC\_Os03g52460.1  
AT4G39210.1  
AT2G21590.1  
Phvu1.011G044000  
Phvu1.009G023100  
LOC\_Os01g44220.1  
LOC\_Os05g50380.1  
Phvu1.009G059800  
Phvu1.001G012500  
AT1G27680.1  
LOC\_Os07g13980.1  
Phvu1.001G219900  
AT1G05610.1

PAVPLGANYRLIDIPVSNCLNSNISKIYVLTQFNASLNRHLSRAYASNMGGYKNEGFVE  
PAVPLGANYRLIDIPVSNCLNSNVSKIYVLTQFNASLNRHLSRAYASNMGGYKNEGFVE  
PAVPLGANYRLIDIPVSNCLNSNVSKIYVLTQFNASLNRHLSRAYGNNIGGYKNEGFVE  
PAVPLGANYRLIDIPVSNCLNSNISKIYVLTQFNASLNRHLSRAYGNNIGGYKNEGFVE  
PAVPIGGAYRLIDVPMSCINCINSKINKVYILTQYNSASLNRHLARAYNS-NGLGFGDGYVE  
PAVPIGGAYRLIDVPMSCINCINSKINKVYILTQYNSASLNRHIARAYNSGNGVTFDGDYVE  
PAVPIGGAYRLIDVPMSCINCINSKINKVYILTQFNASLNRHLSRAYNFSNGVAFDGDYVE  
PAVPVGGCYRMIDIPMSNCINCINCINKIFVLTQFNASLNRHLARTYFG-NGINFGDGFVE  
PAVPVGGCYRLIDIPMSNCINCINCINKIFVLTQFNASLNRHLARTYFG-NGINFGGGFVE  
PAVPVGGCYRLIDIPMSNCINCINGLNKIFVLTQFNASLNRHISRTYFG-NGINFGDGCVE  
PAVPVGGCYRLIDIPMSNCINCINGINKIFVLTQFNASLNRHIARTYFG-NGINFGDGTVE  
PAVPVGGCYRLIDIPMSNCINCINGINKIFVMTQFNASLNRHIHTYLG-GGINFTDGSVQ  
PAVPIGGCYRLIDIPMSNCINCINGINKIFIMTQFNASLNRHIHTYLG-GGINFTDGSVE  
PAVPIGGCYRLIDIPMSNCINCINGIRKIFIMTQFNFSLNRHLSRTYSFGMGMNFGDGFVE  
PAVPIGGCYRLIDVPMSCINCINSKINKVYVLTQFNFSLNGHLSRTYNSGNGVNFGGGFVE  
PAVPIGGCYRLIDIPMSNCINCINGIRKIFILTQFNFSLNRHLSRTYNSFGMGMNFGDGFVE  
PAVPVGGCYRLIDIPMSNCINCINKINKIYVLTQFNFSQSLNRHIARTYNGEGVGFDDGFVE  
PAVPVGGCYRLVDIPMSNCINCINKINKIYVLTQFNFSQSLNRHIARTYNGEGVGFDDGFVE  
GAIPIAANYRLIDAVISNCINCINSGITKIYAITQFNSTLSNHLKAYSGFGLGK--DRFVE  
\*:\*... \*:::\* :\*\*\*:\*\* : \*:: :\*\*\*:\*\* \*\*\* \*::\* \*:

AT5G48300.1  
Phvu1.008G284000  
LOC\_Os09g12660.1  
LOC\_Os08g25734.1  
AT5G19220.1  
Phvu1.003G076500  
LOC\_Os03g52460.1  
AT4G39210.1  
AT2G21590.1  
Phvu1.011G044000  
Phvu1.009G023100  
LOC\_Os01g44220.1  
LOC\_Os05g50380.1  
Phvu1.009G059800  
Phvu1.001G012500  
AT1G27680.1  
LOC\_Os07g13980.1  
Phvu1.001G219900  
AT1G05610.1

VLAAQQS--PENPNWFQGTADAVRQYLWLFEEHNV---LEYLILAGDHLRYMDYEFIQ  
VLAAQQS--PENPNWFQGTADAVRQYLWLFEEHNV---LEYLVLAGDHLRYMDYEFIQ  
VLAAQQS--PENPNWFQGTADAVRQYLWLFEEHNV---MEFLILAGDHLRYMDYQKFIQ  
VLAAQQS--PDNPNWFQGTADAVRQYLWLFEEHNV---MEFLILAGDHLRYMDYEFIQ  
VLAATQTPGESGKRWFQGTADAVRQFHWLFEDARS-KDIEDVLIISGDHLRYMDYDFIQ  
VLAATQTPGEAGKKWFQGTADAVRQFHWLFEDPRS-KGIEDVLIISGDHLRYMDYDFVFR  
VLAATQTPGESGKRWFQGTADAVRQFHWLFEDAKA-KDIDDVLIISGDHLRYMDYDFVQ  
VLAATQTPGEAGKKWFQGTADAVRKFLLWVFEDAKN-RNIENIIILISGDHLRYMNYDFVQ  
VLAATQTPGEAGKKWFQGTADAVRKFLLWVFEDAKN-RNIENILILISGDHLRYMNYDFVQ  
VLAATQTPGEAGNRWFQGTADAVRQFTWVFEDAKN-TNIENVLILAGDQLRYMDYMDLVQ  
VLAATQTPGEAGKKWFQGTADAVRQFTWVFEDAKN-THVENVLILAGDHLRYMDYMDLIQ  
VLAATQMPDEP-AGWFQGTADAIRKFMWILEDHYNQNNIEHVILICGDQLRYMNYMELVQ  
VLAATQMPGEA-AGWFQGTADAVRKF IWWLEDYKHKAIHEHILILISGDQLRYMDYMELVQ  
VLAATQTPGETGKKWFQGTADAVRQF IWWVFEDAKN-KNVEHILILISGDHLRYMNYDFVQ  
VLAATQTPGESGSKWAQGTADAVRRF IWWVFEDAKN-KNIEHIMIIPGDHLCRMDYMKLVE  
VLAATQTSGDAGKKWFQGTADAVRQF IWWVFEDAKT-KNVEHVLILISGDHLRYMDYMNDFVQ  
VLAATQTTGESGKRWFQGTADAVRQF LWF FEDARL-KRIENILILISGDHLRYMDYDFVQ  
VLAATQTPGESGKNWFQGTADAVRQF LWF FEDADH-KNIENILILICGDQLRYMDYMDIVQ  
VIAAYQS--LEDQGWQGTADAIRRCLWVFEFPV---TEFLVLPGHHLKMDYKMLIE  
\*:\* \* \* \*\*\*\*\*:\* :\*::: . ::\* :\*:\* :..

AT5G48300.1  
Phvu1.008G284000  
LOC\_Os09g12660.1  
LOC\_Os08g25734.1  
AT5G19220.1  
Phvu1.003G076500  
LOC\_Os03g52460.1  
AT4G39210.1  
AT2G21590.1  
Phvu1.011G044000  
Phvu1.009G023100  
LOC\_Os01g44220.1  
LOC\_Os05g50380.1  
Phvu1.009G059800  
Phvu1.001G012500  
AT1G27680.1  
LOC\_Os07g13980.1  
Phvu1.001G219900  
AT1G05610.1

AHRETDADITVAALPMDEQRATAFGLMKIDEEGRIIEFAEKPKGEHLKAMKVDTTILGLD  
VHRESADITVAALPMDENRATAFGLMKIDEEGRIIEFAEKPKGEQLKAMKVDTTILGLD  
AHRETNADITVAALPMDEERATAFGLMKIDDEGRRIIEFAEKPKGEKLKSMVDTTILGLD  
AHRETDSDITVAALPMDEKRATAFGLMKIDEEGRIIEFAEKPKGEQLKAMVDTTILGLD  
DHRQSGADISISCIPIIDRRASDFGLMKIDDKGRVISFSEKPKGDDLKAMAVDTTILGLS  
NHRESGADITLSCLPMDSDRASDFGLMKIDNKGRILSFSEKPKGEEKAMQVDTTIVLGLS  
SHRQSGADISICCLPIDDSRASDFGLMKIDDTGRVIAFSEKPKGDDLKAMQVDTTIVLGLP  
HHVDSKADITLSCAPVDESRASEYGLVNIIDRSGRVWHFSEKPTGIDLKSMQDTTMHGLS  
SHVDSNADITLSCAPVDESRASEYGLVKIDRGRVWHFSEKPTGVDLKSMQDTTMLGLS  
SHVDRNADITVSCAAGVDSRASDYGLVKVDGRGRIIHFSEKPKGPDLLKAMQVDTSVFGLL  
NHVDRNADITVSCAAGVDSRASDYGLVKVDDRGRVIFSEKPKGDDMTAMQADTSLGLS  
KHVDDNADITLSCAPIDGSRASDYGLVKFDSSGRVIFSEKPKGADLESKVDTSFLSYA  
KHVDDNADITLSCAPVDESRASEYGLVKFDSSGRVIFSEKPKGDTLEAMKVDTSFLNFA  
RHVDTNADITVSCVPMDDSRASDYGLMKIDKTGRIVQFAEKPKGSOLLKAMRVDTTLLGLS  
KHNASKADITVSCVPMDESGALDHGVMKIDRNGRITFVENLNETDVNTMRVDTRLLGLS  
KHIESNADITVSCLPMDSESRASDFGLLKDQSGKIIQFSEKPKGDDLKAMQVDTTIVLGLP  
KHVDKADISVACVPVDESRASEYGLVKVDERGRICQFLEKPKGELLSRSMHVDTSIFGLS  
KHINSCADISVSCLPVDSRASDFGLVKVDERGRICQFLEKPKGELLSRSMHVDTSIFGLS  
DHRRSRADITIVGLSSVTDHDFGFGFMEVDSTNAVTRFTIKGQQLISVANRTATRS---  
\* :\*::: . \*::: \* . : \* : :

AT5G48300.1  
Phvu1.008G284000  
LOC\_Os09g12660.1  
LOC\_Os08g25734.1  
AT5G19220.1  
Phvu1.003G076500  
LOC\_Os03g52460.1  
AT4G39210.1  
AT2G21590.1  
Phvu1.011G044000  
Phvu1.009G023100  
LOC\_Os01g44220.1  
LOC\_Os05g50380.1  
Phvu1.009G059800  
Phvu1.001G012500  
AT1G27680.1  
LOC\_Os07g13980.1  
Phvu1.001G219900  
AT1G05610.1

DQRAKEMPFIASMGIVVSRDVMLDLR-NQFPGANDFGSEVIPGATSIGL RVQAYL YDG  
DERAKEMPYIASMGIVVSKNVMLNLLR-EKFPAANDFGSEVIPGATSIGL RVQAYL YDG  
TERAKELPYIASMGIVVSKDVMLKLLR-QNFPAANDFGSEVIPGATEIGMRVQAYL YDG  
DVRAKEMPYIASMGIVVSKNVMLQLLR-EQFPGANDFGSEVIPGATNIGMRVQAYL YDG  
KEEA EKPYIASMGIVVFKKEILLNLLR-WRFPTANDFGSEIIP-FSAKEFYVNAVYLFND  
KDEAQKPYIASMGIVVFKKEILLNLLR-WRFPTANDFGSEVIP-ASAREYMKAYLFND  
QDEAEKPYIASMGIVVFKKEILLNLLR-WRFPTANDFGSEIIP-ASAKEINVKAYLFND  
HQEA AKSPYIASMGIVVCFKTEALLKLLT-WRYPSSNDFGSEIIP-AAIKDHNVQGYIYRD  
HQEATDSPYIASMGIVVCFKTEALLNLLT-RQYPSNDFGSEVIP-AAIRDHDVQGYIFRD  
PHEAKKSPYIASMGIVVFKTDVLLKILK-WRYPTSNDFGSEIIP-AAVREHNVHAYLYND  
PPDALKSPYIASMGIVVFKTDVLLNLLK-CRHPTSNDFGSEIIP-AAVRDHNVQSYFFRD  
IDDKQKYPYIASMGIVVKKDVLLDILK-SKYAHLQDFGSEILP-RAVLEHNVKACVFTE  
IDDPTKFPYIASMGIVVFKRDVLLNLLK-SRYAELHDFGSEILP-RALHEHNVQAYVFAD  
PQEA EKHPYIASMGIVVFRTE TLQLLR-WQYSSCNDFGSEIIP-SAVSEHHVQAYLFND  
AEDA EKYPFISP MGIVVFRTEVLLKLLR-WSCPSCNDLGSELIP-SSLRDHKVQAYM FNE  
PKEAAESP YIASMGIVVFRKEVLLKLLR-SSYPTSNDFGSEIIP-LAVGEHNVQAF LFND  
PEVADTCKYMASMGIVVFRDILLRLLR-GHYPTANDFGSEVIP-MAAKDYNVQAYL FDG  
AQEARKFPYIASMGIVVKIDVLLKVL SRGCYPNANDFGSEVIP-LAADFNVAQLFNG  
--DGTSSCSVPSAGIYVIGREQMVKLLR-ECLIKSKDLASEIIPGAISEGMKVKAHMFDG  
..\*:: . : :: :\* :\*::\*\*::\* :.. ..

AT5G48300.1  
Phvu1.008G284000  
LOC\_Os09g12660.1  
LOC\_Os08g25734.1  
AT5G19220.1  
Phvu1.003G076500  
LOC\_Os03g52460.1  
AT4G39210.1  
AT2G21590.1  
Phvu1.011G044000  
Phvu1.009G023100  
LOC\_Os01g44220.1  
LOC\_Os05g50380.1  
Phvu1.009G059800  
Phvu1.001G012500  
AT1G27680.1  
LOC\_Os07g13980.1  
Phvu1.001G219900  
AT1G05610.1

YWEDIGTIEAFYANL GITKKPVPDF SFYDRSAPIYTQPRYLPPSKMLDADVTDSVIGEG  
YWEDIGTIEAFYANL GITKKPVPDF SFYDRSSPIYTQPRYLPPSKMLDADVTDSVIGEG  
YWEDIGTIEAFYANL GITKKPVPDF SFYDRSAAIYTQPRYLPPSKVLDADVTDSVIGEG  
YWEDIGTIEAFYANL GITKKPVPDF SFYDRSAPIYTQPRHLPPSKVLDADVTDSVIGEG  
YWEDIGTIRSF FEANLALTEH-PGAF SFYDAAKPIYTSRRNLPPSKIDNSKLI DSII SHG  
YWEDIGTIRSF FEANLALTEH-PSRFSFYDAAKPMYTSRRNLPPSKIDNSKIVDSII SHG  
YWEDIGTIKSF FEANLALAEQ-PPRF SFYDANKPMYTSRRNLPPSKMINNSKITDSII SHG  
YWEDIGTIKSF YEANLALVEE-HPKF EFYDQNTPFYTSRFLPPTKTEKCRIVNSVISHG  
YWEDIGTIKTF YEANLALVEE-RPKF EFYDQNTPFYTSRFLPPTKAEKCRMVDSII SHG  
YWEDIGTIKSFYDANLALTEE-NPMFKFYDPKTP IYTSRLLPPTKIDKCRIVDAIISHG  
YWEDIGTIKSFYDANLALTEE-SHEFEFYDPKTP IYTSRFLPPTKIDKSRIVDAIISHG  
YWEDIGTIKSF FDANLALTEQ-PPKF EFYDQNTPFYTSRFLPPTKAEKCRIVDAIISHG  
YWEDIGTIRSF FDANLALCEQ-PPKF EFYDQNTPFYTSRFLPPTKAEKCRIVDAIISHG  
YWEDIGTIKSF FDANLALTEQ-PPKF EFYDQNTPFYTSRFLPPTKAEKCRIVDAIISHG  
YWRDMGTIKSF LEANLALTEQ-SPKF EFYDQNTPFYTSRFLPPTKAEKCRIVDAIISHG  
YWEDIGTIGSF FDANLALTEQ-PPKF QFYDQNTPFYTSRFLPPTKAEKCRIVDAIISHG  
YWEDIGTIKSF FEANLALTDQ-SPNFYFYDQNTPFYTSRFLPPTKAEKCRIVDAIISHG  
YWEDIGTIKSF FDANLALMDQ-PPKF QFYDQNTPFYTSRFLPPTKAEKCRIVDAIISHG  
YWEDVRSIGAYYRANMESIKS----YRFYDRQCPLYTMRCLPPSSMSVAVITNSIIGDG  
\*\*.\*: :\* :: \*\*: . : \*\*\* ::\* \*\*\*: . : ::::\*\*

AT5G48300.1  
Phvu1.008G284000  
LOC\_Os09g12660.1  
LOC\_Os08g25734.1  
AT5G19220.1  
Phvu1.003G076500  
LOC\_Os03g52460.1  
AT4G39210.1  
AT2G21590.1  
Phvu1.011G044000  
Phvu1.009G023100  
LOC\_Os01g44220.1  
LOC\_Os05g50380.1  
Phvu1.009G059800  
Phvu1.001G012500  
AT1G27680.1  
LOC\_Os07g13980.1  
Phvu1.001G219900  
AT1G05610.1

CVIKNCKIHHSVGLRSCISEGAI IEDSLLMGADYYETATEKSLLSAKG--SVPIGIGKN  
CVIKNCKIHHSVGLRSCISEGAI IEDTLMLMGADYYETADAKRFLAAKG--SVPIGIGRN  
CVRHCTINHSVGLRSCISEGAVIEDSLLMGADYYETETDKKALSETG--GIPIGIGKN  
CVIKNCKIHHSVGLRSCISEGAI IEDSLLMGADYYETADKLLGEG--GIPIGIGKN  
SFLTNCLIEHSVIGIRSRVGSNVQLKDTVMLGADYYETAEVAALLAEG--NVPIGIGEN  
SFLMNSLIEHSVVGIRSRINSNVHLKDTVMLGADFYETDAEVAELLAEG--RVPIGIGEN  
CFLDSCRIEHSVVGIRSRIGSNVHLKDTVMLGADFYETDLERGE LLAEG--KVPIGIGEN  
CFLGEC SIQRSIIGERSRLDYGVELQDTLMLGADSYQTESEIASLLAEG--NVPIGIGRD  
CFLRECSVQRSIIGERSRLDYGVELQDTLMLGADYYQTESEIASLLAEG--KVPIGIGKD  
CFLRECIQHSIVGERSRLDYGVELQDTVMMGADYYQTESEIASLLAEG--KVPIGIGRN  
CFLRECTVQHSIVGERSRLDYGVEIQDTVMMGADYYQTESEIASLLAEG--KVPIGIGRN  
CSFSECTIEHSVIGISSRVSIGELKDTMMM GADQYETEETSKLLFEG--KVPIGIGEN  
CFLRECTIEHSIVGVRSLNSACELKNTMMM GADLYETEDEISRLSEG--KVPIGVGEN  
CFMRNCSVQHSIVGVRSLNESGVELQDTMMM GADYYQTESEIASLLAEG--KVPIGVGEN  
CFLNKCKVQHSIVGQRSRLAESGVELQDTMMM GADYYQDSEIATLLAEG--KVPVGVGEN  
CFLRECSVQHSIVGIRSRLESGLVQLQDTMMM GADFYQTEAEIASLLAEG--KVPVGVQGN  
CFLTECSVDRSVIGVRSRLPGVQLKDTMMM GADYYQTEAERFSELSDG--KVPVGVGEN  
CFLKECTVEHSIVGIRSRLESGLVQLKDTMIMGADYYQTEAEIASLLAEG--NVPIGIGKN  
CILDKCVIRGSVGMRTIADEVIVEDSIIIVGSDIYEMEDVRRKGKEKKEIRIGIGE  
. : . : \*:\* : : : ::::\*\*:\* : : : : \*:\*..

AT5G48300.1	SHIKRAIIDKNARIGDNVKIINSDNVQEAARETDGYFIKSGIVTVIKDALIPTGTVI
Phvu1.008G284000	SHVKRAIIDKNARIGENVKILNSDNVQEAARETDGYFIKSGIVTVIKDALIPSGTVI
LOC_Os09g12660.1	AHIRKAIIDKNARIGENVKIIINVDNIQEASRETDGYFIKSGIVTVIKDALIPSGTVI
LOC_Os08g25734.1	CHIRRAIIDKNARIGDNVKIINVDNVQEAARETDGYFIKSGIVTVIKDALLPSGTVI
AT5G19220.1	TKIQECIIDKNARVGNVVIANSEGIQEADRSSDGFYIRSGITVILKNSVIKDGVI
Phvu1.003G076500	TKIKDCIIDKNARIGKNVVIANSEGIQEADRSSDGFYIRSGITVILKNSVIEDGLII
LOC_Os03g52460.1	TKIQNCIIDKNARIGKNVTISNSEGVQEADRTSEGFYIRSGITVILKNSIADGLVI
AT4G39210.1	TKIRKCIIDKNAKIGKNVIMNKDDVKEADRPEEGFYIRSGITVIVVEKATIKDGTVI
AT2G21590.1	TKIRKCIIDKNAKIGKNVIIMNKGDVQEADRPEEGFYIRSGITVIVEKATIQQDGTVI
Phvu1.011G044000	TKIRNCIIDKNAKIGKDVIIIMNKDGVQEADRPEDGFYIRSGITVILEKATIEDGTVI
Phvu1.009G023100	TKIRNCIIDKNAKIGKDVIIKNKDDVQEADRPEDGFYIRSGITVILKNAEKATIEDGTVI
LOC_Os01g44220.1	TKIRNCIIDMNAIRGRNVIIANTQGVQESDHPPEEGYIRSGIIVILKNATIKDGTVI
LOC_Os05g50380.1	TKINNCIIDMNAIRVGRNVVITNSEGVQESDRPEEGYIRSGIIVILKNATIKDGKVI
Phvu1.009G059800	TKIRNCIIDKNAKIGRNVIANADGVQEADRAKEGFYIRSGITITLKNATIKDGTVI
Phvu1.001G012500	TKIRNCIIDKNAKIGKNVIANADGVQEADKPEEGFYIRSGIIVIVKNATIKDGTVI
AT1G27680.1	TKIKNCIIDKNAKIGKNVIANADGVVEEGDRPEEGFHIRSGITVVLKNATIRDGLHI
LOC_Os07g13980.1	TIIRNCIIDKNARIGKNVMIMNSQNVQEAERPLEGFYIRSGITVVLKNAVIPDGTVI
Phvu1.001G219900	TKIVNCIIDKNARIGNSVIIANKDNVQEADRGSEGFYIRSGIIVVLKDSEIPNATII
AT1G05610.1	SRIRRAIVDKNARIGKNVMIINRDNVEEGNREAQGYVIREGIIIIILRNAVIPNDSIL
	: .*: * **::* . * * * .::*. : :*: *::*: ... :

También con las secuencias se realizó el árbol filogenético (Figura 14).

Por analogía con las subunidades AT5G48300 (AGPS 2) de *Arabidopsis*, LOC\_Os09g12660 (AGPS1) y LOC\_Os08g25734 (AGPS2) de arroz clasificamos a Phvu1.003G076500 de frijol como AGPS1.

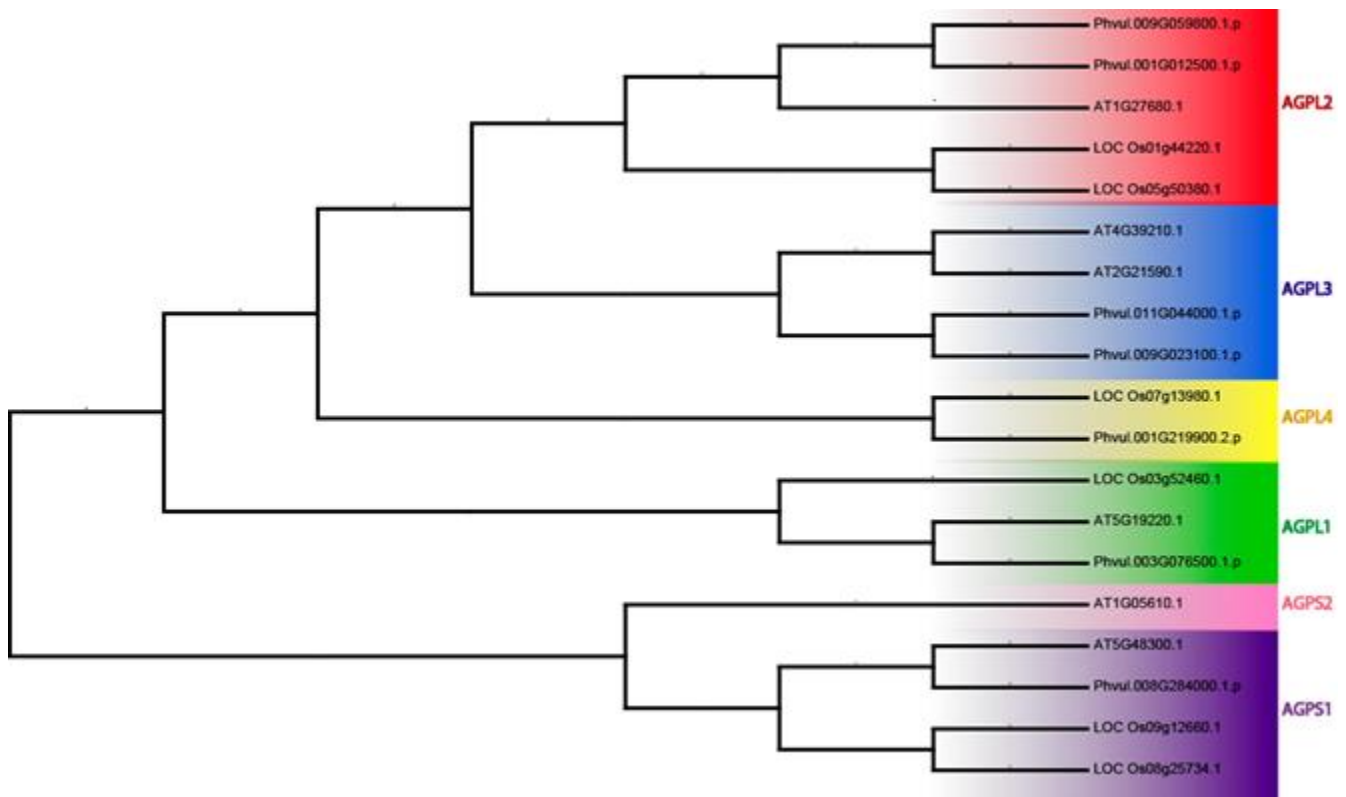
En el grupo de las subunidades AGPS2 se agruparon las secuencias AT1G05610 de *Arabidopsis* y LOC\_Os08g25734 de arroz. En frijol no se encontraron secuencias similares.

El grupo formado por las subunidades AGPL1 incluye a las secuencias AT5G19220 de *Arabidopsis*, LOC\_Os03g52460 de arroz y Phvu1.003G076500 de frijol.

Las subunidades AGPL2 de *Arabidopsis* AT1G27680 y LOC\_Os01g44220 LOC\_Os05g50380 de arroz, se agruparon con las secuencias Phvu1.009G059800 y Phvu1.001G012500 de frijol, a las que se denominó AGPL2a y AGPL2b, respectivamente.

El grupo de subunidades AGPL3 incluyó a las secuencias AT4G39210 (AGPL3) y AT2G21590 (AGPL 4) de *Arabidopsis*, y Phvu1.011G044000 y Phvu1.009G023100 de

frijol. En este caso el alineamiento de las secuencias mostró mayor similitud entre la subunidad AGPL3 de *Arabidopsis* con las secuencias de frijol, por lo que las secuencias de frijol se denominaron AGPL3a (Phvul.011G044000) y AGPL3b (Phvul.009G023100).



**Figura 14. Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de las subunidades de AGPasa de *Arabidopsis*, arroz y frijol.** Abreviaturas: AT, *A. thaliana*; Phvul, *Phaseolus vulgaris*; LOC *Oryza sativa*; AGPL, ADP-glucosa pirofosforilasa subunidad grande; AGPS, ADP-glucosa pirofosforilasa subunidad pequeña.

La secuencia de la subunidad AGPL4 de arroz (LOC\_Os07g13980) mostró alta homología con la secuencia Phvul.001G219900 de frijol, por lo que esta última se clasificó como AGPL4.

Una vez clasificadas las subunidades de AGPasa en frijol, se investigaron algunas de sus características (Tabla 6).

Todas las subunidades de AGPasa tienen un peso molecular muy similar, sin embargo, algunas de ellas tienen diferencias importantes en los valores de su punto isoeléctrico.

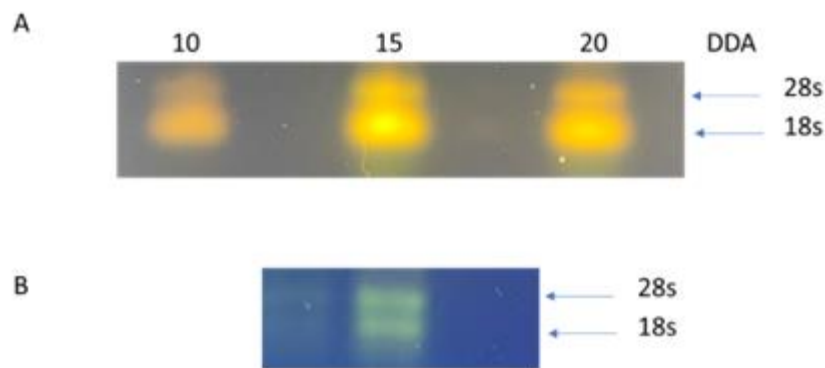
**Tabla 6. Clasificación de las subunidades de AGPasa en frijol.**

<b>Subunidad</b>	<b>Identificador</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Número de aminoácidos</b>	<b>Peso (kDa)</b>	<b>Punto isoeléctrico</b>
ADP-glucosa pirofosforilasa pequeña 1	Phvul.008G284000	AGPS1	516	56.24	6.23
ADP-glucosa pirofosforilasa grande 1	Phvul.003G076500	AGPL1	522	57.84	8.95
ADP-glucosa pirofosforilasa grande 2a	Phvul.009G059800	AGPL2a	529	58.45	8.54
ADP-glucosa pirofosforilasa grande 2b	Phvul.001G012500	AGPL2b	521	56.82	7.92
ADP-glucosa pirofosforilasa grande 3a	Phvul.011G044000	AGPL3a	529	58.47	8.39
ADP-glucosa pirofosforilasa grande 3b	Phvul.009G023100	AGPL3b	526	57.86	6.33
ADP-glucosa pirofosforilasa grande 4	Phvul.001G219900	AGPL4	532	58.47	8.51

## 8.2 Medición de la expresión de los genes de las subunidades de AGPasa en vainas de frutos de frijol

Con el objetivo de evaluar si los genes de las subunidades de AGPasa (AGPS, AGPL1, AGPL2a, AGPL2b, AGPL3a, AGPL3b y AGPL4) se expresan en la vaina del fruto de frijol, se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla 2) para medir su expresión mediante RT-PCR.

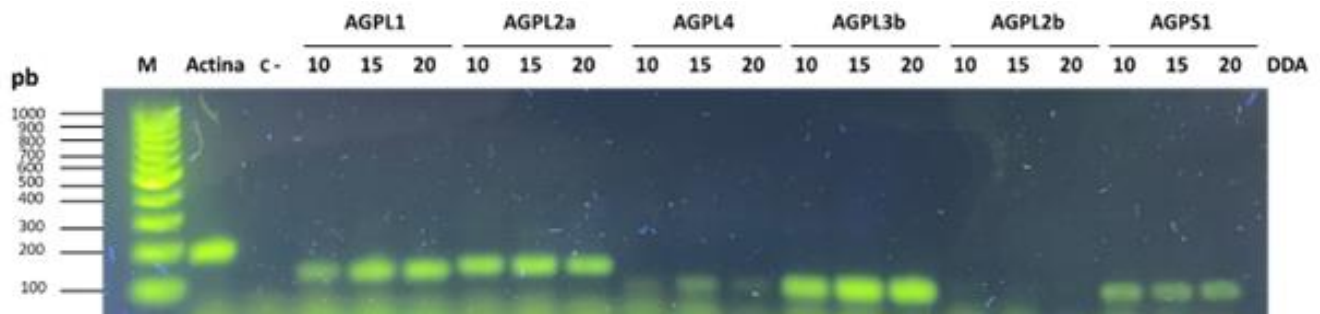
Se realizó la extracción de RNA de vainas de fruto de frijol de 10, 15 y 20 DDA. Posteriormente se cuantificó y se realizó un gel de agarosa 2% para determinar su integridad, estandarizando la cantidad de RNA utilizado (Figura 15).



**Figura 15. A, integridad de RNA de vainas de fruto de frijol de 10, 15 y 20 DDA. B, integridad de RNA hoja de planta de frijol.**

Después se realizó la amplificación por RT-PCR de los genes de las subunidades de AGPasa seleccionadas y los resultados se presentan en la Figura 16.





**Figura 16. Expresión de genes que codifican subunidades de AGPasa en vainas de fruto de frijol de 10, 15 y 20 DDA.** Los productos de las reacciones de RT-PCR fueron separados en un gel de agarosa. M, corresponde al marcador, la amplificación de actina se usó como control positivo y c- indica el control negativo. Abreviaturas: AGPL, ADP-glucosa pirofosforilasa subunidad grande; AGPS, ADP-glucosa pirofosforilasa subunidad pequeña.

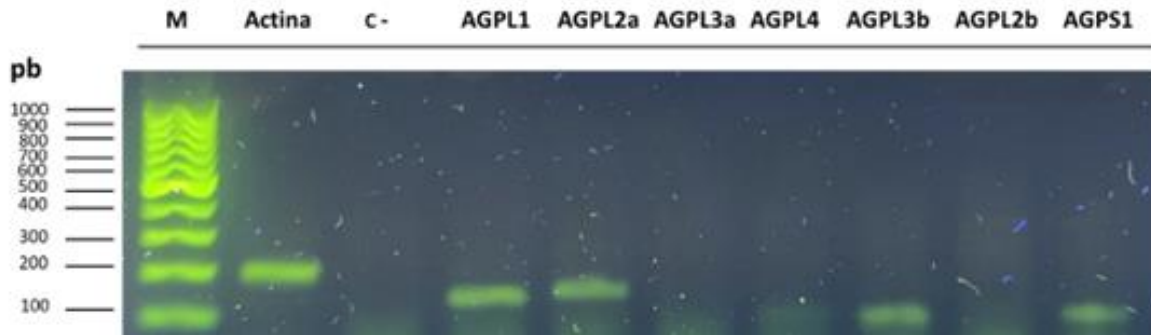
Se encontró que los genes de las subunidades AGPL1, AGPL2a, AGPL4, AGPL3b y AGPS1 de AGPasa se expresan en vainas de 10, 15 y 20 DDA.

Se observó que la expresión de las subunidades AGPL2a, AGPL3b y AGPS1 fue alta y muy similar en las muestras de 10, 15 y 20 DDA. Allí también se aprecia que la expresión de AGPL1 aumenta conforme se desarrolla la vaina.

En el caso de AGPL4 su expresión es baja, pero se observa que aumenta a 15 DDA y disminuye a 20 DDA.

Para la subunidad AGPL3a no se observó expresión en la vaina.

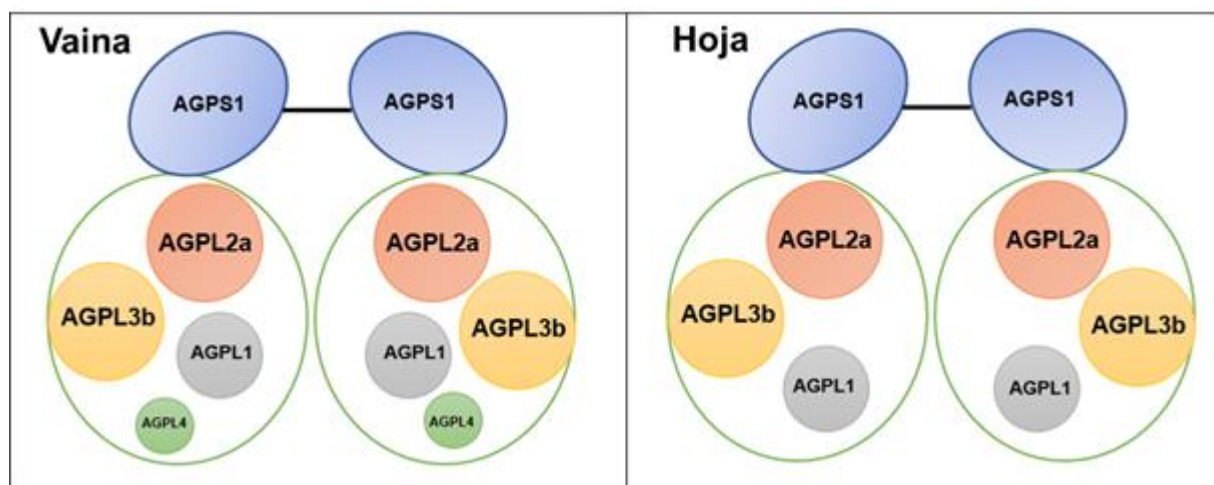
Para saber si el patrón de los genes que codifican a las subunidades de AGPasa es específico de este órgano, también se midió su expresión en hojas de frijol. Los resultados se presentan en la Figura 17.



**Figura 17. Expresión de genes que codifican a subunidades de AGPasa en hojas de frijol.** Los productos de las reacciones de RT-PCR fueron separados en geles de agarosa. M corresponde al marcador, la amplificación de actina se usó como control positivo y c- indica el control negativo. Abreviaturas: AGPL, ADP-glucosa pirofosforilasa subunidad grande; AGPS, ADP-glucosa pirofosforilasa subunidad pequeña.

Como se puede observar, en hojas hay una expresión elevada de los genes que codifican a las subunidades AGPL1 y AGPL2a. La expresión de los transcritos de las subunidades AGPL3b y AGPS1 fue menor. En el caso de AGPL3a y AGPL4 no se observó expresión de los genes.

La Figura 18 muestra una comparación relativa de la expresión de los genes de las subunidades de AGPasa en la vaina y hoja de frijol. Como puede verse, los niveles de expresión de los genes AGPL1, AGPL2a, AGPL3b y AGPS1 son muy parecidos en ambos casos, destacando que AGPL4 solo se expresa en vaina.

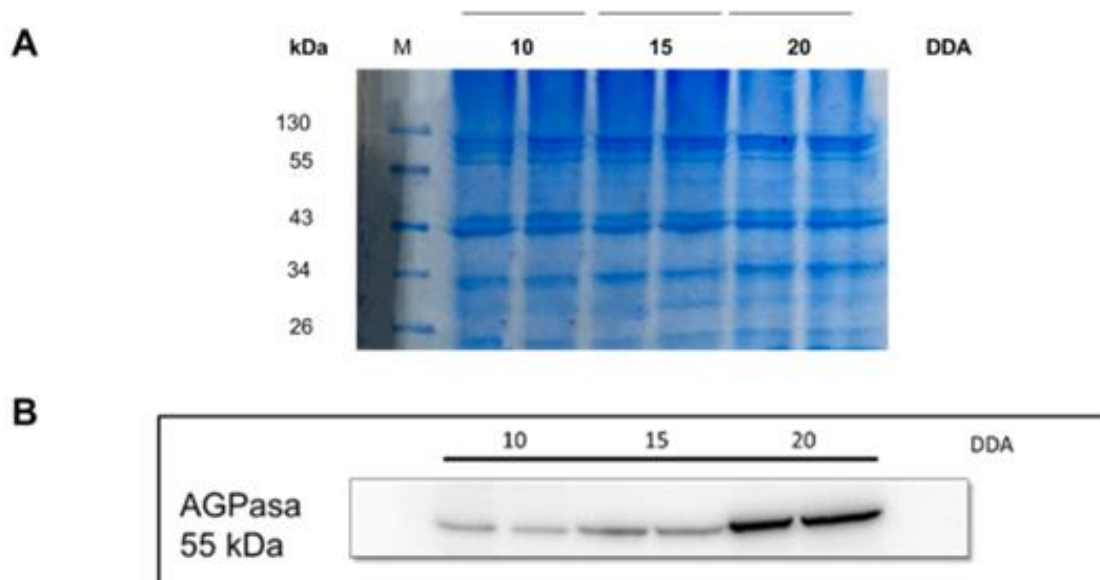


**Figura 18. Representación relativa de los niveles de expresión de los genes que codifican a las subunidades de AGPasa en vaina y hoja.** Abreviaturas: AGPL, ADP-glucosa pirofosforilasa subunidad grande; AGPS, ADP-glucosa pirofosforilasa subunidad pequeña.

### 8.3 Cantidad de AGPasa en vainas de fruto de frijol

Posteriormente se evaluó la cantidad de AGPasa presente en vainas de 10, 15 y 20 DDA, para determinar si los niveles de expresión de las subunidades que conforman a la AGPasa y la cantidad de proteína están correlacionados.

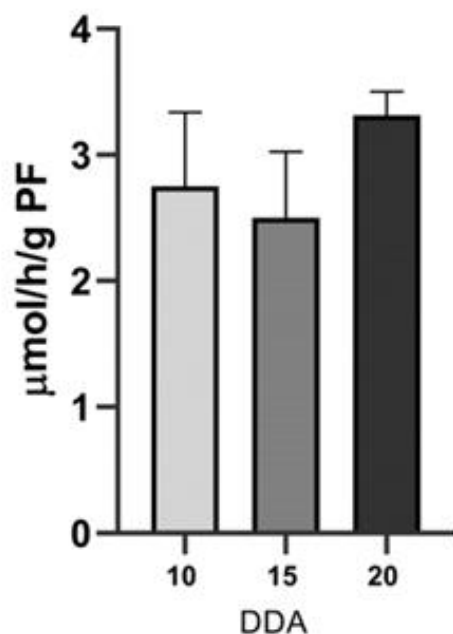
Se determinó la cantidad de proteína presente en cada extracto y se ajustaron los volúmenes para tener la misma cantidad en todas las muestras. El gel obtenido se muestra en la Figura 19 A. Mediante un ensayo de inmunodetección, los anticuerpos específicos contra la subunidad grande de la enzima AGPasa reconocieron a una proteína de 55 kDa, cuya intensidad va aumentando conforme se desarrolla la vaina (Figura 19B).



**Figura 19. Análisis de la expresión de la subunidad grande de AGPasa en vainas de frutos de frijol.** A, Gel SDS-PAGE de los extractos de vainas de fruto de frijol de 10, 15 y 20 teñido con Coomassie coloidal. B, Western-blot usando anticuerpos contra la subunidad grande de AGPasa.

### 8.3.1 Actividad de AGPasa en vainas de fruto de frijol de 10, 15 y 20 DDA

Posteriormente, se midió la actividad de AGPasa. Los resultados obtenidos indican, que la actividad no aumenta conforme se desarrolla la vaina, sino que permanece casi constante (Figura 20).



**Figura 20. Actividad enzimática de AGPasa en vainas de fruto de frijol de 10, 15 y 20 DDA.** Las barras representan el promedio de la actividad enzimática de ADP-glucosa pirofosforilasa medida en vainas de fruto de frijol a 10, 15 y 20 días después de anthesis (DDA)  $\pm$ DE (desviación estándar). Se cuantificó  $\mu\text{mol/h}$  (hora)/ g PF (gramo de peso fresco) de NADH.

## 9. Discusión de resultados

### 9.1 Análisis bioinformático de los genes que codifican a las subunidades de ADP-glucosa pirofosforilasa

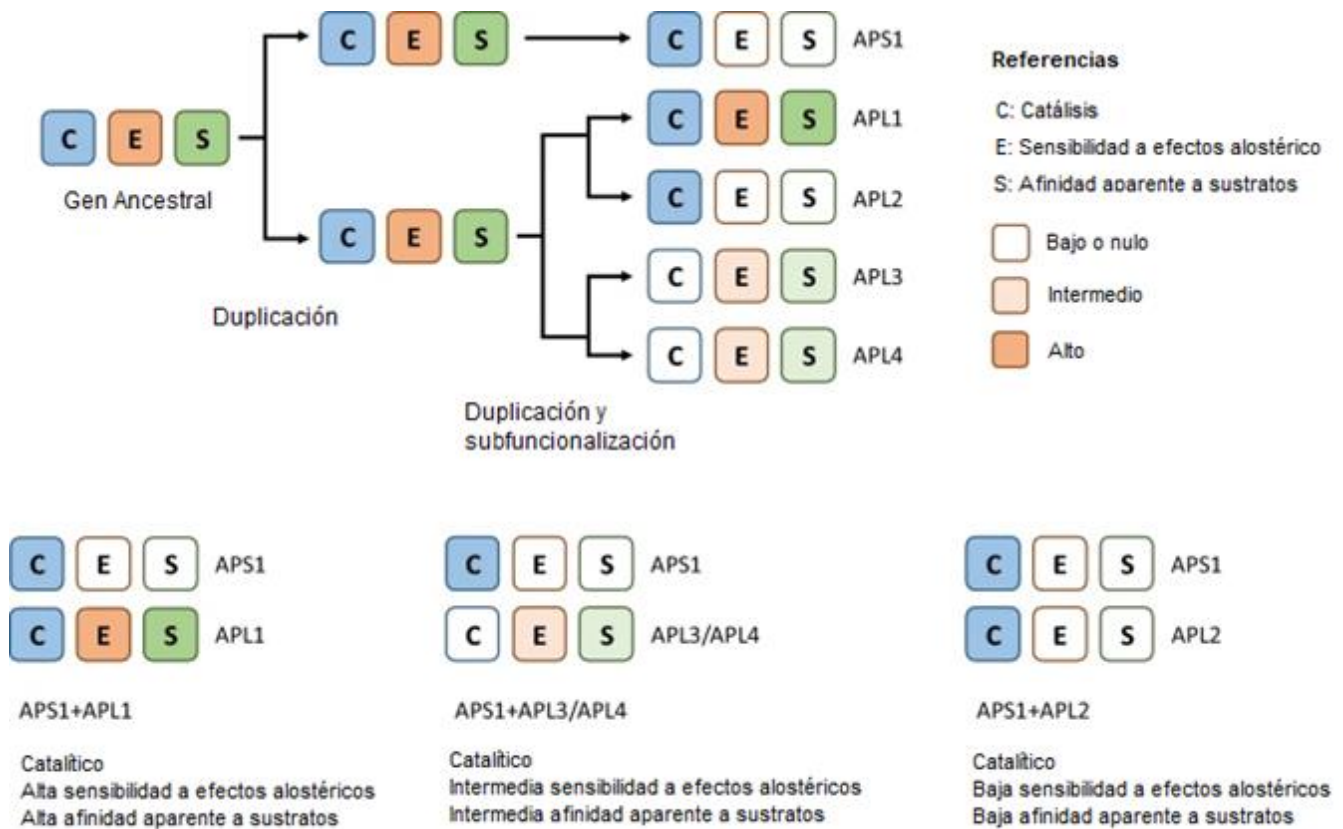
El análisis realizado permitió encontrar 7 secuencias que codifican para las subunidades de AGPasa en frijol (Tabla 4). Su alineamiento con las de arroz y *Arabidopsis* (Figura 14), permitió identificar que 6 de ellas corresponden a la subunidad grande y 1 a la subunidad pequeña de AGPasa (Tabla 6).

Es importante remarcar que a diferencia de arroz y *Arabidopsis*, en frijol solo se encontró un gen que codifica para la subunidad pequeña de AGPasa (AGPS1; Phvul.008G284000). En *Arabidopsis* hay dos genes que codifican la subunidad pequeña (APS1 y APS2); uno de los cuales (APS2) parece ser un pseudogen y cuatro genes que codifican diferentes isoformas de la subunidad grande (APL1-4) (Figueroa *et al.*, 2022).

Se ha sugerido que los genes que codifican ambas subunidades evolucionaron a partir de un ancestro común por proceso de duplicación y subfuncionalización (Ballicora *et al.*, 2005).

El alga verde *Ostreococcus tauri* (*O. Tauri*) es una de las primeras especies que se separó del ancestro común de las algas verdes y las plantas (Derelle *et al.*, 2006). El análisis de los genes que en esa especie codifican a ambas subunidades muestra que durante la evolución la subunidad pequeña retuvo la función de facilitar la solubilidad del complejo, mientras que la subunidad grande concentró las funciones catalíticas y reguladoras (Figura 21) (Figueroa *et al.*, 2022). Sin embargo, eso no es una regla general pues en el caso de la AGPasa de papa, la subunidad pequeña adquirió propiedades catalíticas y mantuvo características que facilitan la solubilidad del complejo, mientras que la subunidad grande mantuvo la función reguladora (Kuhn *et al.*, 2013).

Es por eso que en ocasiones las diferencias entre subunidades no son muy claras. Tal es el caso de los genes que codifican para la subunidad AGPL2 (AGPL2a y AGPL2b) de frijol que tienen alta homología con AGPL2 de *Arabidopsis* y AGPL2 y AGPL3 de arroz.



**Figura 21. Subfuncionalización de las diferentes subunidades AGPasa encontradas en *Arabidopsis*.** Las funciones ya presentes en el gen ancestral fueron heredadas por los duplicados que sufrieron subfuncionalización (APS1), o duplicación y subfuncionalización (APL1-4). La combinación de la subunidad pequeña (APS1) con diferentes subunidades grandes (APL1-4) produce heterotetrámeros catalíticamente activos con propiedades cinéticas y reguladoras particulares. Modificado de Figueroa *et al.*, (2022).

## 9.2 AGPasa en la vaina de frijol

El análisis experimental de AGPasa en la vaina se planteó a tres niveles: expresión de los genes que codifican a las subunidades, cantidad de proteína y actividad enzimática.

### 9.2.1 Expresión de los genes que codifican a las subunidades de AGPasa

El análisis por PCR de la expresión de los genes que codifican a las subunidades de AGPasa en la vaina de los frutos de frijol, mostró que, durante el periodo de 10, 15 y 20 DDA las subunidades AGPS1, AGPL2a, AGPL3b y AGPL1 se expresan abundantemente y sin muchos cambios; mientras que el gen que codifica a la subunidad AGPL4 se expresa poco, aunque alcanza un nivel un poco más alto a los 25 DAA (Figura 16).

El patrón de expresión en hojas mostró resultados similares (Figura 17). Sin embargo, el gen que codifica a subunidad AGPL4 solo se expresa en la vaina. Si los transcritos de todas las subunidades se traducen con la misma eficiencia, la actividad de AGPasa en la vaina de los frutos corresponde a una mezcla de complejos. Aquellos en los que interviene la subunidad AGPL4 serán exclusivos de la vaina (Figura 18).

### 9.2.2 Cantidad de proteína y actividad de AGPasa

Los resultados del ensayo de inmunodetección de la subunidad grande de AGPasa muestran que la cantidad de AGPasa se incrementa fuertemente en el periodo de 10 a 20 DAA (Figura 19 B). Este resultado indica que los niveles de expresión de las subunidades de AGPasa no tienen una correlación directa con la cantidad de proteína y que en la vaina de los frutos de frijol la cantidad de AGPasa está sujeta a una regulación postranscripcional (Rösti *et al.*, 2006).

Por su parte, la evaluación de la actividad de AGPasa (Figura 20) no mostró grandes cambios durante el periodo analizado; lo que sugiere que la actividad también podría estar sujeta a una regulación postraducciona (Tiessen *et al.*, 2002), que en este caso compensa las diferencias en las cantidades de proteína: la poca enzima presente a 10 DAA tiene una actividad específica mucho más alta que la de la enzima que se encuentra con mayor abundancia en vainas de 20 DAA.

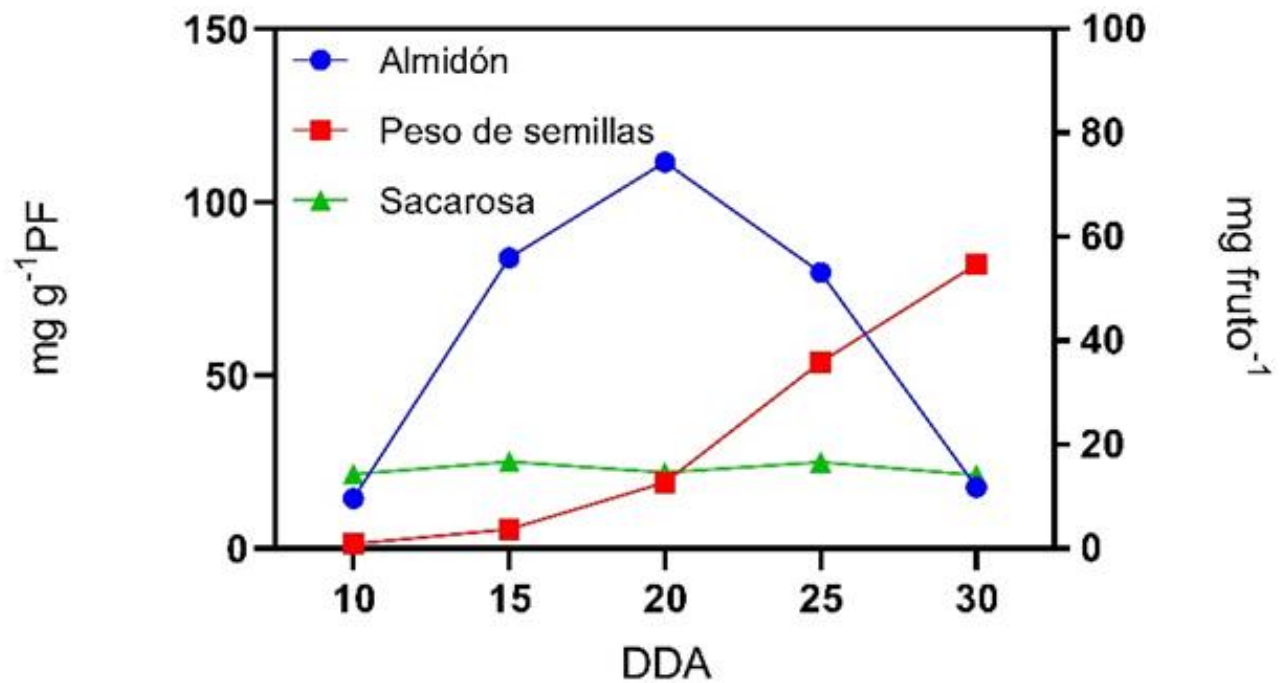


Esta situación puede ser un reflejo de la existencia de complejos diferentes cuya existencia se anticipa a partir del patrón de expresión de los genes que codifican a las distintas subunidades (Figura 18). En este sentido es importante mencionar que la funcionalidad de las subunidades de AGPasa de *L. punctata* (lenteja de agua) expresadas en levadura está determinada por la manera en cómo se asocian, resultando que algunos complejos no son activos y otros tienen una actividad baja (Wang et al., 2022).

Nuestros resultados indican que la actividad de AGPasa medida *in vitro* no determina la cantidad de almidón que se puede acumular en esta estructura; sin embargo, la concentración de metabolitos reguladores son otro elemento que puede modificar la actividad específica de AGPasa en la vaina de los frutos de frijol. Recientemente, Ferretti et al. (2022) describieron el efecto de glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato en la actividad de AGPasa en *Anabaena* (homotetrámero). La glucosa-6-fosfato quintuplicó la actividad ( $A_{0,5}$  1,4 mM) y produjo una disminución de un orden de magnitud en la afinidad relativa por glucosa-1-fosfato; mientras que la fructosa 6-fosfato aumentó la actividad 14 veces ( $A_{0,5}$  0,9 mM), sin modificar la afinidad por el sustrato.

En ese sentido es importante mencionar que el análisis del flujo de sacarosa a los frutos de frijol muestra que este permanece casi constante durante su desarrollo (Figura 22). Es probable que durante los primeros 10 días la cantidad suministrada exceda las necesidades de semillas en una fase incipiente de su desarrollo; lo que podría traducirse en un incremento en la concentración de metabolitos activadores que podrían incrementar la actividad específica de la enzima y favorecer la síntesis de almidón, cuya concentración se incrementa notablemente en el periodo de 10 a 20 DAA (Figura 22).

Finalmente, resultados obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que la vaina funciona como un órgano que sintetiza almidón a partir de los excedentes de sacarosa y la actividad elevada de AGPasa durante ese periodo podría ser importante para que los excedentes de sacarosa se usen eficientemente.



**Figura 22.** Relación entre la cantidad de almidón (en azul), sacarosa (en verde) y peso de las semillas (en rojo) en la vaina de fruto de frijol del 10 al 30 DDA. Incremento del peso de las semillas durante el desarrollo de la vaina de fruto de frijol ( $\text{mg fruto}^{-1}$ ) durante el periodo de 10 a 30 días después de anthesis (DDA). Cantidad de sacarosa y almidón ( $\text{mg g}^{-1}$  PF) presentes en la vaina durante el periodo de 10 a 30 DDA. PF representa peso fresco.

## 10. Conclusión

Los resultados obtenidos indican que durante los primeros 20 días del desarrollo de los frutos de frijol, los genes que codifican a la AGPasa se expresan diferencialmente; lo que sugiere la existencia de múltiples complejos (algunos de ellos tal vez sean exclusivos de este órgano), que podrían tener diferentes propiedades. Nuestros datos también señalan que en la vaina del fruto de frijol la actividad de AGPasa está controlada a niveles traduccional y postraduccional, y que la actividad medida *in vitro* no tiene una relación directa con la cantidad de almidón que se acumula en esta estructura. Sin embargo, distintos mecanismos permiten que su actividad se mantenga elevada durante la etapa en la que el desarrollo incipiente de las semillas podría generar excedentes de carbono, contribuyendo a facilitar la conversión de estos en almidón que se usará en la etapa de crecimiento acelerado de las semillas.

## 11. Perspectivas

- Estudiar en qué medida la actividad de la AGPasa es afectada por posibles diferencias en la composición de los complejos, y si ello determina su respuesta a compuestos activadores.

## 12. Referencias

- Ap Rees, T., & Hill, S. A. (1994). Metabolic control analysis of plant metabolism. *Plant, Cell & Environment*, 17(5), 587-599.
- Ávila JA., Ávila JM., Rivas FJ. & Martínez D. (2014). El cultivo del frijol, sistemas de producción en el noroeste de México. Universidad de Sonora. Departamento de Agricultura y Ganadería. México. [En línea]. Disponible en: <https://agricultura.unison.mx/memorias%20de%20maestros/EL%20CULTIVO%20DEL%20FRIJOL.pdf> [Ultimo acceso el 15 de septiembre de 2022]
- Ballicora, M. A., Frueauf, J. B., Fu, Y., Schürmann, P., & Preiss, J. (2000). Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 275(2), 1315–1320.
- Ballicora, M. A., Iglesias, A. A., & Preiss, J. (2004). ADP-glucose pyrophosphorylase: a regulatory enzyme for plant starch synthesis. *Photosynthesis Research*, 79(1), 1–24.
- Ballicora, M., Dubay, J., Devillers, C., & Preiss, J. (2005). Resurrecting the ancestral enzymatic role of a modulatory subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 280(11), 10189–10195.
- 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.
- Bennett, E. J., Roberts, J. A., & Wagstaff, C. (2011). The role of the pod in seed development: Strategies for manipulating yield. *New Phytologist*, 190(4), 838–853.
- Bernal, L., & Martínez, E. (2006). Una nueva visión de la degradación del almidón. *Revista del Centro de Investigación. Universidad La Salle*, 7(25), 77-90.

- Blennow, A., Bay-Smidt, A. M., Leonhardt, P., Bandsholm, O., & Madsen, M. H. (2003). Starch paste stickiness is a relevant native starch selection criterion for wet-end paper manufacturing. *Starch-Stärke*, 55(9), 381-389.
- Borisjuk, L., Rolletschek, H., Wobus, U., & Weber, H. (2003). Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds. *Journal of Experimental Botany*, 54(382), 503-512.
- 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.
- Buleon, A., Colonna, P., Planchot, V., & Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23(2), 85-112.
- Caspar, T., Lin, T.-P., Kakefuda, G., Benbow, L., Preiss, J., & Somerville, C. (1991). Mutants of *Arabidopsis* with altered regulation of starch degradation. *Plant Physiology*, 95(4), 1181–1188.
- Crookston, R. K., O'Toole, J., & Ozbun, J. L. (1974). Characterization of the bean pod as a photosynthetic organ 1. *Crop Science*, 14(5), 708-712.
- De Jong, A., Koerselman-Kooij, J. W., Schuurmans, J. A., & Borstlap, A. C. (1996). Characterization of the uptake of sucrose and glucose by isolated seed coat halves of developing pea seeds. evidence that a sugar facilitator with diffusional kinetics is involved in seed coat unloading. *Planta*, 199(4), 486–492.
- Derelle, E., Ferraz, C., Rombauts, S., Rouzé, P., Worden, A. Z., Robbens, S., ... & Moreau, H. (2006). Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(31), 11647-11652.
- Ferrero, D. M., Piattoni, C. V., Asencion Diez, M. D., Rojas, B. E., Hartman, M. D., Ballicora, M. A., & Iglesias, A. A. (2020). Phosphorylation of ADP-glucose pyrophosphorylase during wheat seeds development. *Frontiers in Plant Science*, 11.

- Ferretti, M. V., Hussien, R. A., Ballicora, M. A., Iglesias, A. A., Figueroa, C. M., & Asencion Diez, M. D. (2022). The ADP-glucose pyrophosphorylase from Melainabacteria: A comparative study between photosynthetic and non-photosynthetic bacterial sources. *Biochimie*, 192, 30–37.
- Figueroa, C. M., Asencion Diez, M. D., Ballicora, M. A., & Iglesias, A. A. (2022). Structure, function, and evolution of plant ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Molecular Biology*, 1-17.
- Geigenberger, P. (2011). Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. *Plant Physiology*, 155(4), 1566-1577.
- Geigenberger, P., Stitt, M., & Fernie, A. R. (2004). Metabolic control analysis and regulation of the conversion of sucrose to starch in growing potato tubers. *Plant, Cell & Environment*, 27(6), 655-673.
- Geiger, D. R., & Servaites, J. C. (1994). Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C3 plants. *Annual review of plant biology*, 45(1), 235-256.
- Gómez-Casati DF, Iglesias AA (2002) ADP-glucose pyrophosphorylase from wheat endosperm. Purification and characterization of an enzyme with novel regulatory properties. *Planta* 214:428–434.
- Hendriks, J. H. M., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M., & Geigenberger, P. (2003). ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of Arabidopsis and other plant species. *Plant Physiology*, 133(2), 838–849.
- Hernández V. M., Vargas M., Luisa P., Muruaga J. S., Hernández S., & Mayek N. (2013). Origen, domesticación y diversificación del frijol común: Avances y perspectivas. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(2), 95-104.
- IICA, Proyecto Red SICTA, COSUDE. (2008). Guía de identificación y manejo integrado de las enfermedades del frijol en América Central. [En línea]. Disponible en:

- <http://repiica.iica.int/docs/B0891E/B0891E.pdf> [Último acceso el 15 de junio de 2023].
- James, M. G., Denyer, K., & Myers, A. M. (2003). Starch synthesis in the cereal endosperm. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), 215-222.
- Jones, J. B. (1982). Hydroponics: Its history and use in Plant Nutrition Studies. *Journal of Plant Nutrition*, 5(8), 1003–1030.
- Kacser, H., Burns, J. A., Kacser, H., & Fell, D. A. (1995). The control of Flux. *Biochemical Society Transactions*, 23(2), 341–366.
- Kuhn, M. L., Figueroa, C. M., Iglesias, A. A., & Ballicora, M. A. (2013). The ancestral activation promiscuity of ADP-glucose pyrophosphorylases from oxygenic photosynthetic organisms. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1).
- Lara, M. (2015.). El cultivo del frijol en México. Revista digital universitaria Disponible en: <https://www.revista.unam.mx/vol.16/num2/art09/> [Último acceso el 15 de junio de 2023].
- Lemus, D. M., Piedra, S. D. G., & Rico, L. D. F. (2015). Análisis sectorial y de la dinámica de los precios del frijol en México. *Compendium: Cuadernos de Economía y Administración*, 2(3), 1-21.
- Lichtner, F. T., & Spanswick, R. M. (1981). Sucrose uptake by developing soybean cotyledons. *Plant Physiology*, 68(3), 693–698.
- López, M., Fernández, F., & Schoonhoven, A. V. (1985). Frijol: Investigación y producción: Referencia de los cursos de capacitación sobre frijol dictados por el Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT.
- Michalska, J., Zauber, H., Buchanan, B. B., Cejudo, F. J., & Geigenberger, P. (2009). NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(24), 9908–9913.

- Morales-Santos, M. E., Peña-Valdivia, C. B., García-Esteva, A., Aguilar-Benítez, G., & Kohashi-Shibata, J. (2017). Características físicas y de germinación en semillas y plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) silvestre, domesticado y su progenie. *Agrociencia*, 51(1), 43-62.
- Nakagami, H., Sugiyama, N., Mochida, K., Daudi, A., Yoshida, Y., Toyoda, T., Tomita, M., Ishihama, Y., & Shirasu, K. (2010). Large-scale comparative phosphoproteomics identifies conserved phosphorylation sites in plants. *Plant Physiology*, 153(3), 1161–1174.
- Nakamura, Y. (2015). *Starch metabolism and structure*. Springer Japan.
- Rose, C. M., Venkateshwaran, M., Volkening, J. D., Grimsrud, P. A., Maeda, J., Bailey, D. J., Park, K., Howes-Podoll, M., den Os, D., Yeun, L. H., Westphall, M. S., Sussman, M. R., Ané, J.-M., & Coon, J. J. (2012). Rapid phosphoproteomic and transcriptomic changes in the rhizobia-legume symbiosis. *Molecular Cellular Proteomics*, 11(9), 724–744.
- Rösti, S., Rudi, H., Rudi, K., Opsahl-Sorteberg, H. G., Fahy, B., & Denyer, K. (2006). The gene encoding the cytosolic small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase in barley endosperm also encodes the major plastidial small subunit in the leaves. *Journal of Experimental Botany*, 57(14), 3619-3626.
- Schoonhoven A. & Voysest O. (1991). *Common Bean: Research for Crop Improvement*. CAB-Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Redwood Press Ltd, United Kingdom.
- Smith, A. M. (2001). The biosynthesis of starch granules. *Biomacromolecules*, 2(2), 335-341.
- Stadler R., K. M. Wright, C. Lauterbach, G. Amon, M. Gahrtz, A. Feuerstein, K. J. Oparka and N. Sauer (2005) Expression of GFP-fusions in *Arabidopsis* companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. *The Plant Journal* 41:319-331.



- Sulpice, R., Pyl, E. T., Ishihara, H., Trenkamp, S., Steinfath, M., Witucka-Wall, H., & Stitt, M. (2009). Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(25), 10348-10353.
- Tamoi, M., Nagaoka, M., Yabuta, Y., & Shigeoka, S. (2005). Carbon metabolism in the Calvin cycle. *Plant Biotechnology*, 22(5), 355-360.
- Tetlow, I. J. (2004). Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, 55(406), 2131–2145.
- Tiessen, A., Hendriks, J. H., Stitt, M., Branscheid, A., Gibon, Y., Farré, E. M., & Geigenberger, P. (2002). Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *The Plant Cell*, 14(9), 2191-2213.
- Tofiño, A. (2006). Regulación de la biosíntesis del almidón en plantas terrestres: perspectivas de modificación. *Acta Agronómica*, 55(1), 1-13.
- Urquía, F. N. (2014). La seguridad alimentaria en México. *Salud pública de México*, 56(supl 1), s92-s98.
- Wagstaff, C., Yang, T. J., Stead, A. D., Buchanan-Wollaston, V., & Roberts, J. A. (2009). A molecular and structural characterization of senescing *Arabidopsis* siliques and comparison of transcriptional profiles with senescing petals and leaves. *The Plant Journal*, 57(4), 690-705.
- Wainaina, I., Wafula, E., Sila, D., Kyomugasho, C., Grauwet, T., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2021). Thermal treatment of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.): Factors determining cooking time and its consequences for sensory and nutritional quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3690-3718.
- Wang, M., Dai, Y., Li, X., Ma, X., Li, C., & Tao, X. (2022). Characterization of Various Subunit Combinations of ADP-Glucose Pyrophosphorylase in Duckweed (*Landoltia punctata*). *BioMed Research International*, 5455593.

- Wardlaw, I. F., & Willenbrink, J. (2000). Mobilization of fructan reserves and changes in enzyme activities in wheat stems correlate with water stress during kernel filling. *New Phytologist*, 148(3), 413-422.
- Weber, H., Borisjuk, L., & Wobus, U. (1997). Sugar import and metabolism during seed development. *Trends in Plant Science*, 2(5), 169-174.
- Williams, L. E., Lemoine, R., & Sauer, N. (2000). Sugar transporters in higher plants—a diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science*, 5(7), 283-290.
- Zeeman, S. C., Kossmann, J., & Smith, A. M. (2010). Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 209-234.
- Zúñiga-Sánchez, E., Martínez-Barajas, E., Zavaleta-Mejía, E., & Gamboa-de-Buen, A. (2017). El floema y la ruta simplástica durante la formación de órganos de demanda. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(3), 249-259.