



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE INVERTASAS Y
SACAROSA SINTASA Y SU CORRELACIÓN CON LOS NIVELES DE
CARBOHIDRATOS EN LAS VAINAS DEL FRIJOL, *PHASEOLUS*
VULGARIS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

HÉCTOR GABRIEL ORTÍZ LANDÍN

DIRECTORA DE TESIS

DRA. LILIA ANGÉLICA BERNAL GRACIDA



Ciudad Universitaria, CD.MX., 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: Profesora: M. en C. Rodríguez Penagos Mireya

VOCAL: Profesor: Dr. Martínez Barajas J. Eleazar

SECRETARIO: Profesora: Dra. Bernal Gracida Lilia Angélica

1er SUPLENTE: Profesor: Dr. Pedraza Chaverri José

2do SUPLENTE: Profesor: Dr. Ávila Chávez Euclides

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

ASESOR DEL TEMA: Dra. Bernal Gracida Lilia Angélica

SUSTENTANTE: Ortiz Landin Héctor Gabriel

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo se realizó con el financiamiento DGAPA, proyecto PAPIIT IN226520 y con el financiamiento de la Facultad de Química PAIP 5000-9127.

Resumen

Los nutrientes en la planta del frijol se almacenan en las vainas de donde se distribuyen hacia las semillas, permitiendo que éstas completen su desarrollo de manera exitosa. En una primera etapa del crecimiento de los frutos, las vainas funcionan como un órgano de demanda en donde se almacenan grandes cantidades de carbohidratos en forma de almidón y azúcares solubles; en una segunda etapa, en la cual las semillas muestran un crecimiento acelerado, la vaina funciona como un órgano fuente de nutrientes, que degrada el almidón almacenado y utiliza los azúcares para el crecimiento de las semillas en función de sus necesidades.

En este trabajo se utilizó el genotipo G26 de la planta de frijol común, *Phaseolus vulgaris*, para determinar si existe una correlación entre los niveles de azúcares solubles y la actividad enzimática de invertasas y sacarosa sintasa, durante la primera etapa de desarrollo de la vaina (10, 15 y 20 DDA). Los resultados obtenidos indican que el balance de las actividades enzimáticas entre INV (CWIN, VIN y CIN) y SuSy determinan el perfil de azúcares, al inicio (10 DDA) la actividad de INV predomina sobre la actividad de SuSy y disminuye gradualmente, mientras que la SuSy incrementa su actividad, siendo esta última la responsable de los altos niveles de fructosa a 20 DDA, el aumento en la actividad de SuSy, no se relaciona directamente con su cantidad de proteína lo que sugiere un fuerte control postraducciona, además de la regulación transcripcional que presenta.

Índice general

1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1 Importancia del cultivo de frijol	2
2.2 La planta del frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	4
2.2.1 Características generales de la planta	
2.2.2 Condiciones de desarrollo de la planta	
2.2.3 Etapas de desarrollo de la planta	
2.3 Metabolismo y transporte de azúcares	7
2.4 Regulación de la actividad de las enzimas que degradan sacarosa	10
2.4.1 Regulación a nivel transcripcional de INV y SuSy	
2.4.2 Regulación a nivel postraducciona l de INV y SuSy	
3. Antecedentes	14
4. Hipótesis	16
5. Objetivos	16
6. Materiales y métodos	17
6.1 Material biológico	17
6.2 Análisis de la actividad enzimática	17
6.2.1 Preparación de los extractos de proteína	
6.2.2 Invertasas ácidas	
6.2.3 Invertasas neutras	
6.2.4 Sacarosa sintasa (SuSy)	
6.3 Cuantificación de proteínas	18
6.4 Extracción de RNA	19
6.5 Síntesis de cDNA	19
6.6 RT-PCR	19
6.7 Inmunodetección de SuSy	20
6.8 Electroforesis en gel de agarosa para cDNA	21

6.9 Análisis bioinformático.....	21
7. Resultados	21
7.1 Cuantificación de glucosa y fructosa en vainas de frijol de 10, 15 y 20 DDA.....	21
7.2 Actividades enzimáticas en las vainas de los frutos de frijol de 10, 15 y 20 DDA	22
7.2.1 Actividad de las invertasas	
7.2.2 Actividad de la SuSy	
7.3 Inmunodetección de la SuSy	24
7.4 Análisis de la expresión de los genes de la SuSy en las vainas de frijol de 10, 15 y 20 DDA	24
8. Discusión de resultados	29
9. Conclusiones	32
10. Perspectivas	32
11. Referencias	33

Índice de figuras

Figura 1. Producción mundial del frijol	3
Figura 2. Productores de frijol a nivel mundial	3
Figura 3. Rendimiento promedio anual de la producción de frijol (ton/ha) de los principales productores (2012-2018)	4
Figura 4. Esquema del fruto del frijol y las partes que lo componen	6
Figura 5. Etapas del desarrollo de la planta del frijol	6
Figura 6. Transporte de sacarosa a través del floema	8
Figura 7. Metabolismo de los azúcares	8
Figura 8. Señalización por sacarosa y hexosas, y su influencia sobre la actividad enzimática de INV y SuSy	10
Figura 9. Asociación de la SuSy a las membranas	12
Figura 10. Compartimentalización vacuolar	13

Figura 11. Cambios en los niveles de azúcares y almidón en la vaina de frijol, durante el desarrollo de las semillas	14
Figura 12. Evaluación de los niveles de azúcares en diferentes genotipos del fruto del frijol de 15 DDA	15
Figura 13. Contenido de glucosa y fructosa en las vainas de frijol de 10,15 y 20 DDA	22
Figura 14. Actividad de las invertasas en vainas de frijol de 10,15 y 20 DDA	23
Figura 15. Actividad de la SuSy en vainas de frijol de 10,15 y 20 DDA	23
Figura 16. Inmunodetección de la SuSy presente en las vainas de frijol de 10, 15 y 20 DDA	24
Figura 17. Expresión de los genes que codifican para SuSy e invertasas en diferentes partes de la planta de frijol	25
Figura 18. Árbol filogenético para genes homólogos de la SuSy e invertasas	25
Figura 19. RNA purificado de vainas de frijol de 10,15, y 20 DDA	27
Figura 20. Control de carga de RNA para el análisis de la expresión de genes	27
Figura 21. Expresión de los genes de la SuSy en vainas de frijol de 10, 15 y 20 DDA	28

Índice de tablas

Tabla 1. Ciclo de temperaturas empleadas en la PCR	19
Tabla 2. Soluciones usadas para la elaboración del gel apilador y el gel separador	20
Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para evaluar la expresión de la SuSy	26

Abreviaciones

DDA: Días después de antesis

SuSy: Sacarosa sintasa

INV: Invertasa

CWIN: Invertasa de pared

VIN: Invertasa vacuolar

CIN: Invertasa citoplásmica

1. Introducción

En las plantas uno de los principales metabolitos sintetizados a partir de la fotosíntesis es la sacarosa. Este metabolito es transportado a través del floema desde tejidos fotosintéticos principalmente hojas, hasta los tejidos de demanda de nutrientes como las raíces, las semillas, o los frutos.

El cultivo de frijol representa para México uno de los más importantes, pues es la leguminosa de mayor consumo en el país y además aporta una importante cantidad de nutrientes a la dieta, sin embargo, mantiene un rendimiento anual bajo de apenas 0.71 ton/ha, mientras que el promedio mundial se mantiene en 1.53 ton/ha (CEDRSSA, 2020), una de las principales causas del bajo rendimiento a nivel nacional es la falta de intensificación tecnológica en las tierras de cultivo, aunado a la problemática de que es una planta susceptible a las sequías y altas temperaturas que afectan la producción nacional. Considerando que la intensificación o implementación tecnológica en los cultivos es una solución cara, muchos estudios optan por implementar una solución con un enfoque bioquímico para encontrar variedades más resistentes a las sequías y altas temperaturas, nuestro trabajo se encuentra dentro de este último aspecto, pretende estudiar el como funciona la distribución de nutrientes en el fruto del frijol.

El fruto del frijol se encuentra conformado por la vaina y sus semillas, pero es la vaina la que además de proteger a las semillas, se encarga de almacenar y de proveer los nutrientes para el crecimiento óptimo de sus semillas, es decir, la planta emplea mecanismos que favorecen que la vaina se constituya como un tejido de demanda durante su desarrollo (10-20 DDA), y posteriormente se comporte como un tejido fuente (20-30 DDA), que puede proveer de fotosintatos a la semilla para su crecimiento o bien como una alternativa para contender con factores abióticos que modifican el suministro de carbono (Belmont et al., 2021).

Una manera de abordar la regulación del metabolismo en la vaina y comprender cómo es que se distribuyen los fotosintatos, es a través de conocer el funcionamiento de las enzimas que están involucradas en el metabolismo de los azúcares. De acuerdo con lo anterior, en este trabajo se estudió la actividad de

las enzimas invertasas (CWIN, CIN y VIN) y de la sacarosa sintasa (SuSy) durante la primera etapa del desarrollo de las semillas (10 a 20 DDA), para definir si existe una correlación entre los niveles de azúcares (glucosa y fructosa) y la actividad de estas enzimas en la vaina. Por otro lado, también se evaluó la expresión de los genes que codifican para estas enzimas con el propósito de conocer a qué nivel se da la regulación de la actividad enzimática tanto de las invertasas como de la SuSy. Estos hallazgos nos permiten comprender la manera en que la planta regula su metabolismo, aspecto que es esencial para desarrollar propuestas dirigidas al aumento en la producción de las semillas de frijol.

2. Marco teórico

2.1 Importancia del cultivo de frijol

La FAO considera al frijol como la leguminosa de mayor consumo en el mundo, cuya cosecha tiene un precio comercial que excede al de otros cultivos de leguminosas combinados entre sí (Broughton et al., 2003; Porch, 2013; Graham y Vance, 2012).

El principal aporte nutricional del frijol se relaciona con su alto contenido proteico, y de carbohidratos, seguido en menor proporción de vitaminas y minerales. La cantidad de proteína disponible varía de 14 a 33% del peso fresco, dependiendo de la variedad del cultivo. Esa proteína es rica en aminoácidos como la lisina (6.4 a 7.6 g/100 g proteína), la fenilalanina y la tirosina (5.3 a 8.2 g/100 g proteína). No obstante, es deficiente en aminoácidos azufrados como metionina y cisteína. En cuanto a los carbohidratos, se estima que por cada 100 g de frijol crudo se dispone de 52 a 76 g dependiendo de la variedad. La mayor parte de los carbohidratos corresponde al almidón, los lípidos representan la fracción más pequeña de macronutrientes (1.5 a 6.2 g /100 g de frijol) que comprende una mezcla de acilglicérols, así como ácidos grasos mono o poliinsaturados. El frijol también aporta una considerable cantidad de fibra (pentosanos, celulosa, hemicelulosa, pectinas y lignina) variando de 14 a 19 g/100 g de semilla (Ulloa et al., 2011).

Debido a que el frijol puede adaptarse a diversas condiciones climáticas, se cultiva en diversas regiones de América Latina, África, Medio Oriente y Europa, y es un producto estratégico para muchos países (CEDRSSA, 2020).

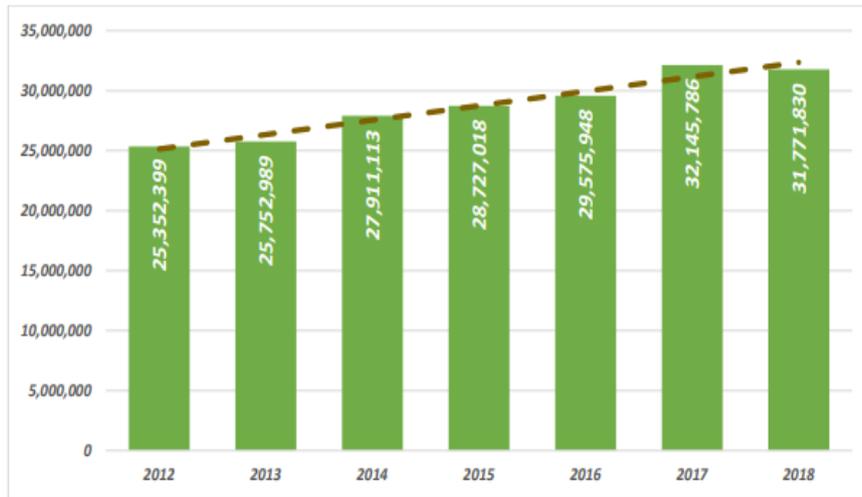


Figura 1. Producción mundial de frijol. La gráfica describe el aumento en la producción de frijol desde el año 2012 hasta el 2018. La línea punteada representa la regresión lineal de los valores de la producción mundial (CEDRSSA, 2020).

Durante el periodo de 2012 a 2018 se observó que la producción de frijol tuvo una tasa de crecimiento anual de 3.3%, alcanzando 32.1 millones de toneladas de frijol en el 2017 (año de mayor producción), no obstante, en 2018 hubo una reducción del 1.2% (Figura 1).

Los principales países productores de frijol en el mundo corresponden a la India (17.3%), Myanmar (16%), Brasil (10.3%) Estados Unidos (4.3%) y China (4.1%) (Figura 2).

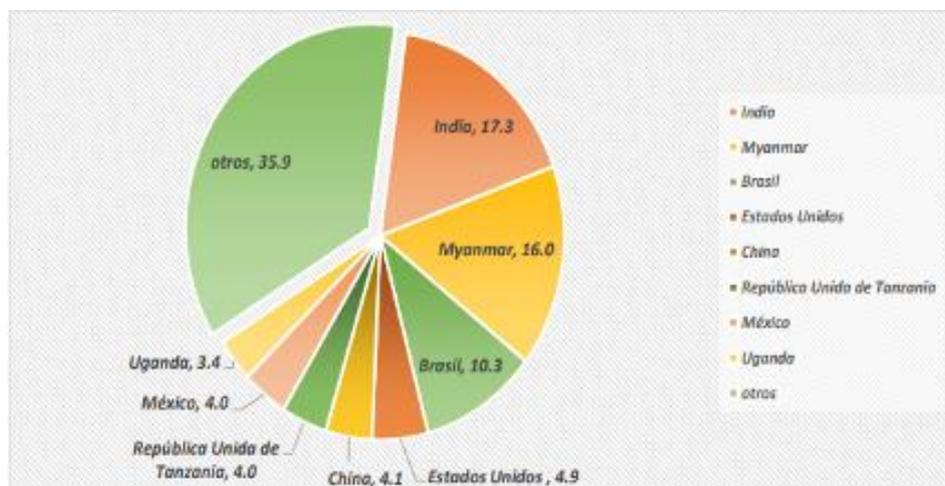


Figura 2. Productores de frijol a nivel mundial. Se aprecian a los principales países productores de frijol con el porcentaje que aportan a la producción total acumulada desde el año 2012 hasta 2018 (CEDRSSA, 2020).

De 2012 a 2018 el rendimiento promedio de producción en el mundo fue de 1.5 ton/ha, no obstante, algunos países productores obtuvieron una producción por arriba del promedio como Estados Unidos (2.04 ton/ha), China (1.67 ton/ha), Myanmar (1.59 ton/ha) y Etiopía (1.56 ton/ha), mientras que en otros el índice de producción estuvo muy por debajo del promedio como en el caso de la India (0.42 ton/ha) y México (0.71 ton/ha). Esto indica que hay países donde la productividad es baja y la producción depende en gran medida de la extensión de tierra cultivada. En esos casos existe una gran oportunidad para mejorar la producción a partir de la aplicación de recursos tecnológicos (Figura 3).

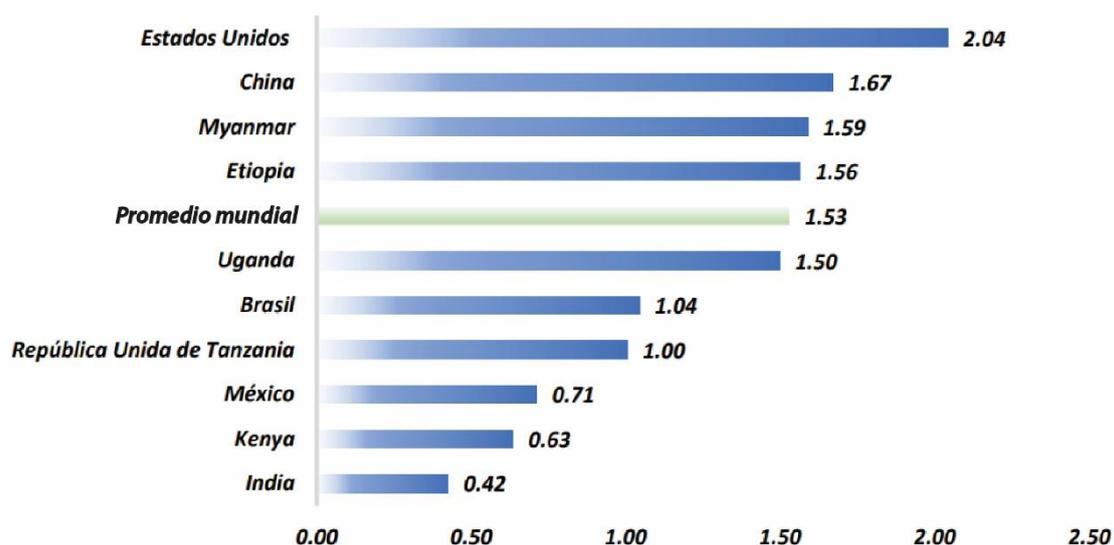


Figura 3. Rendimiento promedio anual de la producción de frijol (ton/ha) de los principales productores (2012-2018) (CEDRSSA, 2020)

2.2 La planta del frijol común (*Phaseolus vulgaris*)

2.2.1 Características generales de la planta

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L) pertenece a la familia Fabaceae (ITIS, 2022). Es una planta herbácea, anual, y autógama lo que significa que su reproducción sexual es por autofecundación (Adams, 1977; McClean et al., 1993; Voysest et al., 1994); puede crecer de manera arbustiva o como una planta trepadora, a la

que comúnmente se le denomina frijol, poroto, judía, alubia o habichuela, entre otros nombres.

El conocimiento acerca de las características morfológicas, agronómicas y genéticas, así como de la edad de los restos fósiles permiten establecer que el frijol común se originó a partir de dos eventos independientes de domesticación que ocurrieron entre los 5000 y 2000 años a.C. (Hernández-López et al., 2013) en Mesoamérica (México y Centroamérica) y los Andes (Sudamérica) de los que provienen las variedades de frijol cultivadas en el mundo (Kaplan y Lynch, 1999).

La planta de frijol tiene tallos débiles y delgados, cuadrangulares o angulados y hojas trifoliadas con ápice acuminado, las raíces pueden crecer a una profundidad de 20 cm llegando a alcanzar hasta un metro de profundidad. Las flores se desarrollan en inflorescencias que pueden ser axilares y terminales. Las flores que aparecen primero tienen mayor probabilidad de concluir exitosamente su desarrollo (Díaz, 1990).

Las vainas también conocidas como ejotes o pericarpio se unen a la planta mediante un pedúnculo; constan de dos valvas con dos suturas, una ventral y otra dorsal sobre la que crecen de tres a seis semillas dispuestas de manera alternada (Arias et al., 2007) (Figura 4). Las vainas comienzan su crecimiento a partir del tercer día después de la anthesis (DDA) y se prolonga hasta los días 12 a 18, en este punto su crecimiento disminuye considerablemente, llegando a medir de 10 a 12 cm (Díaz, 1990). El crecimiento de las semillas se hace evidente a partir de que la vaina se aproxima a alcanzar su tamaño máximo. Las semillas pueden ser oblongas, ovals o redondeadas dependiendo de la variedad, y de múltiples colores (café, café moteado, negro, amarillo paja, rosadas, etc.) (SIAP, 2016).

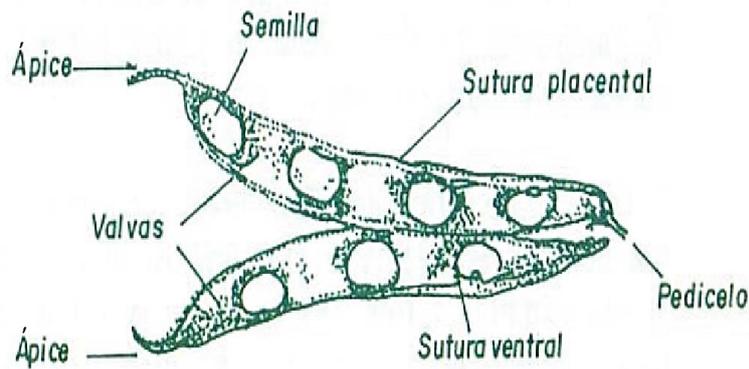


Figura 4. Esquema del fruto del frijol y las partes que lo componen (Arias et al., 2007)

2.2.2 Condiciones de desarrollo de la planta

El cultivo del frijol se desarrolla de manera óptima en un intervalo de temperaturas de 10 a 27°C, pero es muy susceptible a condiciones extremas, crece en suelos de textura ligera y bien drenados con un pH de 6.5 a 7.5 pues es que, dentro de estos intervalos, los nutrientes presentan su mayor disponibilidad (SIAP 2016).

2.2.3 Etapas de desarrollo de la planta

El cultivo de frijol se desarrolla en dos fases sucesivas: la vegetativa y la reproductiva. La primera engloba desde la germinación hasta la aparición de los primeros botones florales y la segunda etapa se extiende desde la floración hasta la madurez de la cosecha (Fernández, 1986) (Figura 5).

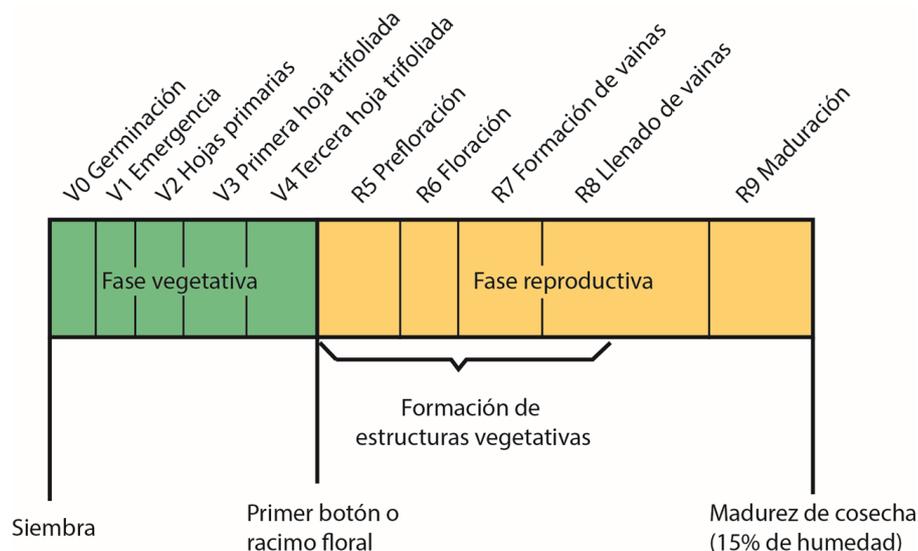


Figura 5. Etapas del desarrollo de la planta de frijol (Fernández, 1986)

2.3 Metabolismo y transporte de azúcares

Los tejidos fotosintéticos aprovechan la energía de la luz visible para fijar el CO₂ presente en la atmósfera y a través del ciclo de Calvin lo transforman en metabolitos que utilizan para su crecimiento y desarrollo (Huber 1983).

El carbono excedente se almacena como almidón o sacarosa que puede guardarse en las vacuolas o distribuirse a través del floema a órganos cuya actividad fotosintética es baja o nula (órganos de demanda: frutos, semillas, raíces y flores) (Smeekens et al., 2010).

Para entrar a los tejidos de demanda, la sacarosa utiliza dos vías alternas, una es la simplástica (transporte pasivo) en donde la sacarosa fluye a través de plasmodesmos (canales) que interconectan el citoplasma de las células adyacentes y le permiten acceder a través de la pared y la membrana celular sin que ello represente un gasto energético (Turgeon and Medville, 1998; Rennie and Turgeon, 2009). La otra alternativa es la vía apoplástica en donde la sacarosa que se libera en el espacio intercelular pasa al interior de la célula utilizando transportadores de azúcares por los que eventualmente serán exportados y que por sus siglas en inglés se conocen SWEETs (Sugars Will Eventually be Exported Transporters). Los SWEETs permiten que la sacarosa se transporte a favor del gradiente de concentración que crea la actividad metabólica de los órganos de demanda (Chen et al., 2012) (Figura 6).

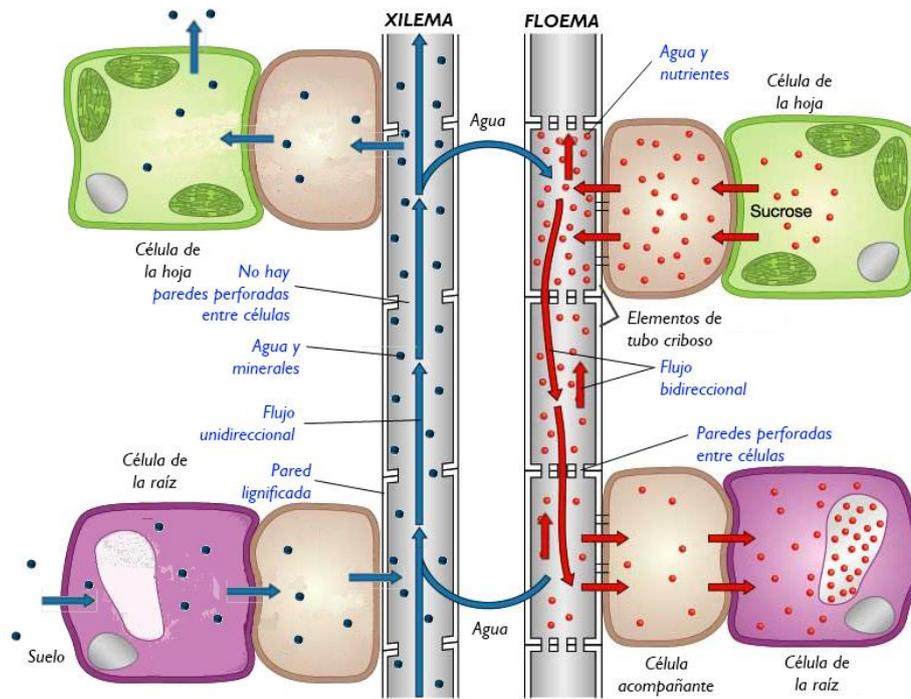
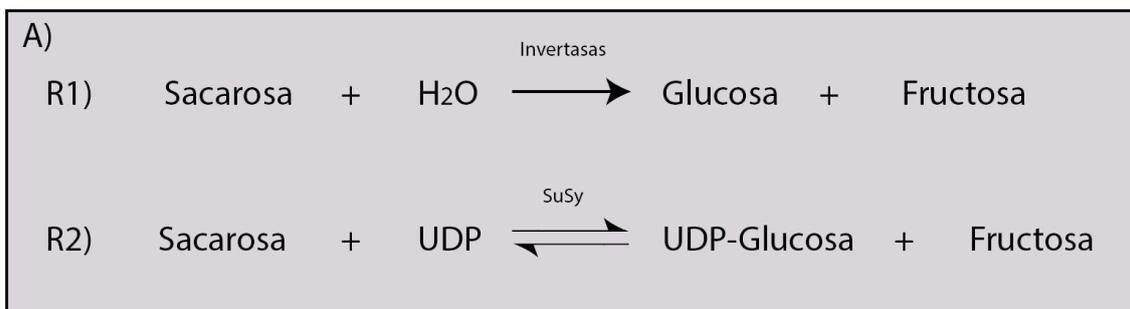


Figura 6. Transporte de sacarosa a través del floema. Se muestra el mecanismo de transporte de sacarosa desde los tejidos fuente a los tejidos de demanda (Alda F, 2010).

La tasa de descarga, uso y la capacidad de almacenamiento de la sacarosa en conjunto determinan la fuerza de demanda de los órganos heterotróficos (Sonnewald et al., 1994; Herbers y Sonnewald, 1998).

Una vez que la sacarosa llega a los tejidos de demanda, las invertasas (R1) la hidrolizan en glucosa y fructosa, en tanto que la SuSy (R2) actúa sobre la sacarosa para formar UDP-glucosa y fructosa (Figura 7A).



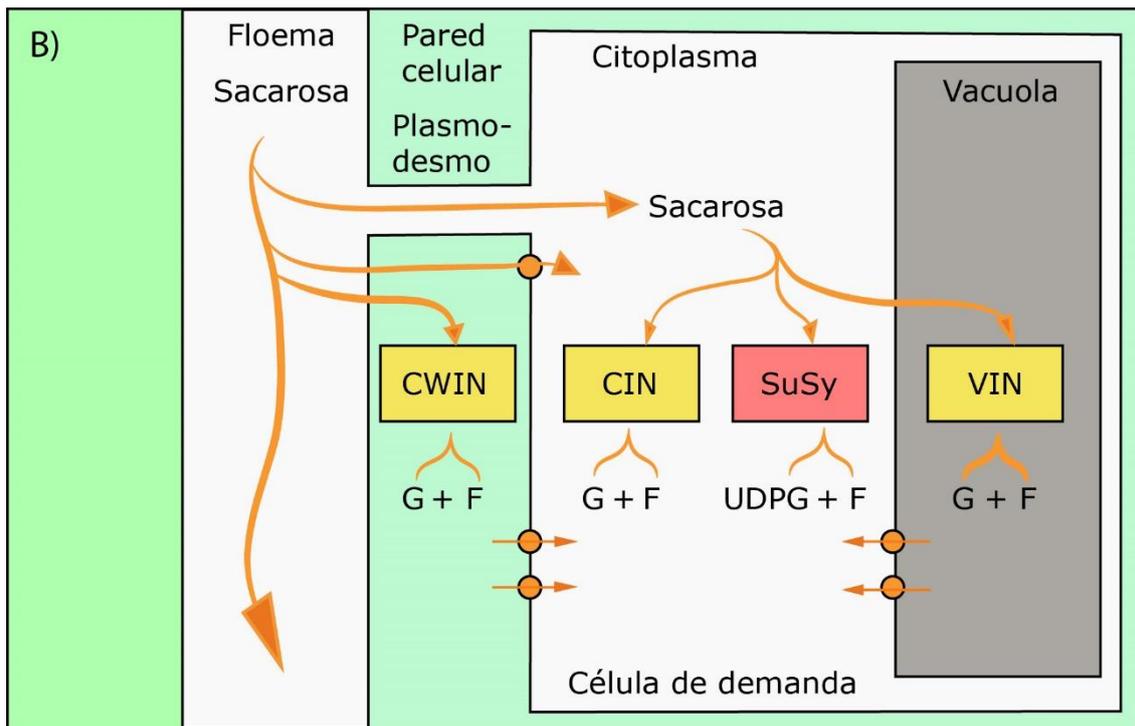


Figura 7. Metabolismo de los azúcares. (A) Reacciones que catalizan las invertasas y la SuSy (B) Esquema del metabolismo de la sacarosa. Una vez que la sacarosa llega al citoplasma es metabolizada por invertasas para producir glucosa y fructosa o bien por la SuSy para formar UDP-glucosa y fructosa (Granot y Stein, 2014; Koch, 2004).

Las invertasas (EC.3.2.1.26) pueden clasificarse dependiendo de su localización en la célula, existen tres tipos, las invertasas de pared (CWIN), las invertasas vacuolares (VIN) y las invertasas citosólicas (CIN), cada una de ellas tiene propiedades específicas (Figura 7B).

Tanto las CWIN como las VIN hidrolizan a la sacarosa y a los residuos de fructosa del disacárido actuando de manera óptima en un intervalo de pH de 4.5 a 5.5, mientras que la CIN lo hace a un pH óptimo de 7.0 a 8.0. (Stitt et al., 1991; Sturm, 1999). Una característica importante de la CWIN es su insolubilidad a diferencia de las VIN y CIN que son enzimas solubles.

En los tejidos de demanda, las invertasas que mantienen mayor actividad son la VIN y CWIN y ambas al hidrolizar a la sacarosa, contribuyen con una alta cantidad de hexosas. La actividad de la CIN es generalmente más baja y es la actividad de SuSy la responsable de degradar la mayor parte de la sacarosa presente en el citoplasma. La actividad de SuSy genera UDP-glucosa y fructosa, lo que contribuye a que los niveles de hexosas dentro del citoplasma sean bajos

y que los mecanismos de señalización mediados por hexosas funcionen adecuadamente (Figura 8). Es importante remarcar que frecuentemente la mayor parte de la sacarosa que entra a la célula es transportada a las vacuolas, donde es almacenada y posteriormente metabolizada por VIN (Koch, 2004).

Por otro lado, los azúcares liberados de las reservas del almidón pueden tener una repercusión importante en el crecimiento y desarrollo de la planta (Kalt-Torres et al., 1987; Eveland and Jackson, 2012; Tognetti et al., 2013; Lastdrager et al., 2014).

En algunas especies, la importación de recursos (sacarosa) a las semillas en desarrollo se encuentra fuertemente correlacionada con la capacidad de las hojas para exportar sus productos asimilados (Wittenbach, 1993).

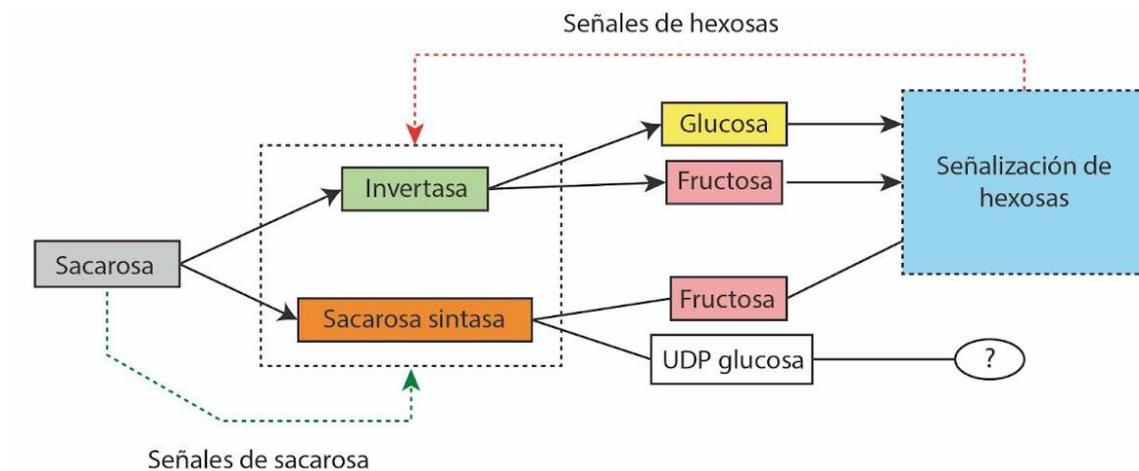


Figura 8. Señalización por sacarosa y hexosas, y su influencia sobre la actividad enzimática de INV y SuSy (Koch, 2004).

2.4 Regulación de la actividad de las enzimas que degradan sacarosa

Las invertasas CWIN, CIN y VIN y la SuSy son responsables del metabolismo de la sacarosa y la comprensión de los mecanismos que regulan su actividad es un tema relevante para entender la fisiología de las plantas y para poder mejorar su productividad. En numerosos estudios se ha observado que esta regulación ocurre tanto a nivel transcripcional como traduccional (Koch, 2004).

2.4.1 Regulación a nivel transcripcional de INV y SuSy

La expresión de las invertasas y de la SuSy se encuentra controlada por diversas señales que provienen de los cambios en la cantidad y del tipo de azúcares

presentes, así como por el balance hormonal que caracteriza cada etapa de desarrollo en la planta. En términos generales, se observa que la actividad de las invertasas es predominante en las etapas iniciales del desarrollo de la vaina y que, a medida que el tejido de almacenamiento entra en la fase de maduración, la actividad de la enzima SuSy se vuelve más importante (King et al., 1997; Bologna et al., 2003).

Los cambios a nivel transcripcional son influenciados por variaciones en el entorno, pues los mecanismos que los provocan dependen de las condiciones prevalentes en el medio ambiente que son capaces de modificar los niveles de algún efector o molécula señalizadora, como el oxígeno o los niveles de azúcares en la célula. Se ha observado que cuando las plantas son sometidas a condiciones en donde hay baja disponibilidad de oxígeno, los genes que codifican para la SuSy se expresan más, mientras que la expresión de los genes de las invertasas requiere de niveles normales de oxígeno (Bologna et al., 2003). Por otro lado, las hexosas (glucosa y fructosa) y la sacarosa también tienen un papel de moléculas señalizadoras, se sabe que pueden afectar la expresión de los genes de INV y de la SuSy (Roitsch et al., 2000; Koch, 2004) (Figura 8).

Cada una de las etapas de crecimiento de la planta tiene un perfil de azúcares característico, al inicio del desarrollo del fruto las VIN y las CWIN maximizan la producción de hexosas, lo que favorece la generación de señales que aumentan la expresión de genes involucrados en la división/expansión celular. A medida que las plantas entran a una etapa de maduración, la actividad de la SuSy se vuelve más relevante, probablemente porque al ser la UDP-glucosa uno de los productos de su actividad, el uso de la energía es más eficiente (Sturm et al., 1999; Weber-Wobus 1997).

2.4.2 Regulación a nivel postraducciona de INV y SuSy

La SuSy es una enzima citosólica, que en algunas especies se encuentra asociada con la membrana plasmática, esta asociación es importante porque le permite suministrar directamente UDP-glucosa al complejo de celulosa sintasa para la biosíntesis de celulosa (Amor et al., 1995) (Figura 9a y Figura 9b).

También puede formar asociaciones con los amiloplastos, el aparato de Golgi, los filamentos de actina y el tonoplasto de la vacuola (Figura 9c). Adicionalmente,

se ha reportado que la enzima puede encontrarse en varios estados de fosforilación y que esa condición podría ser importante para definir su asociación a organelos y membranas celulares (Winter et al., 1997).

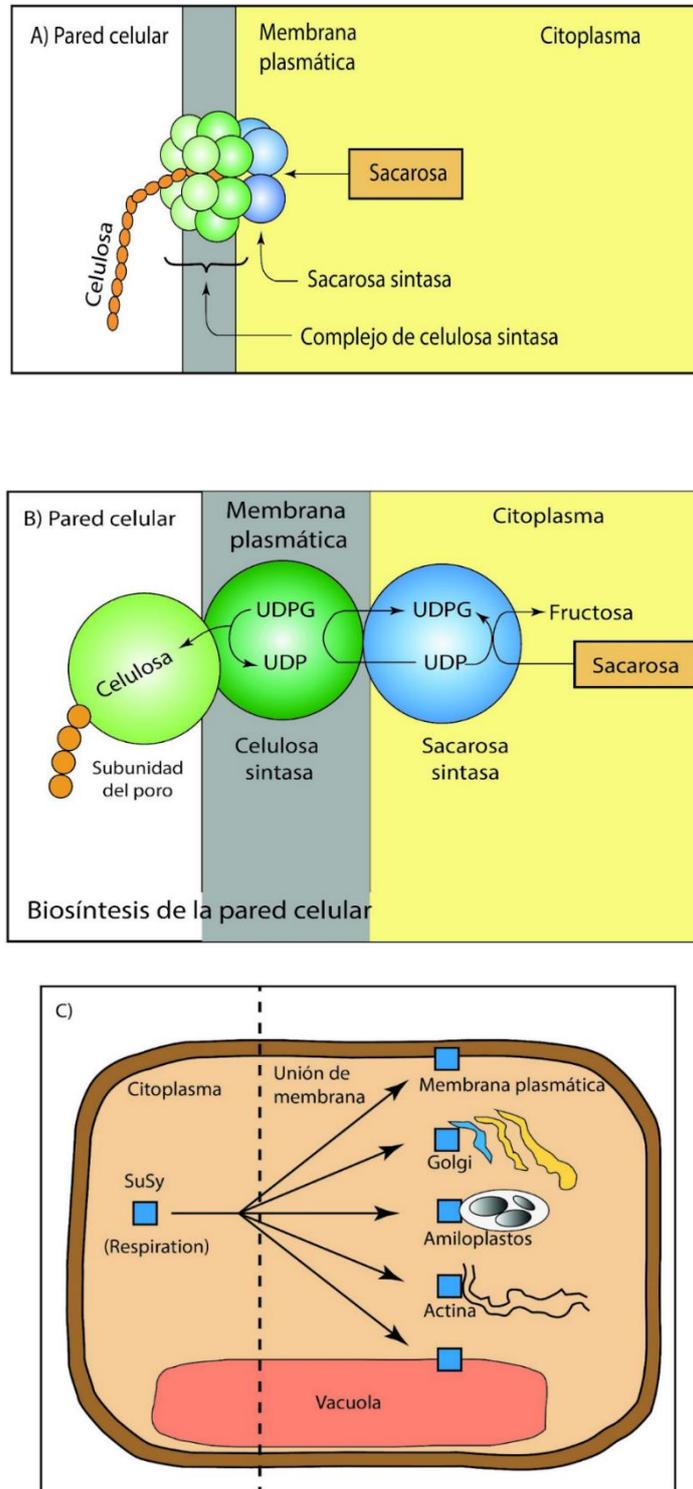


Figura 9. Asociación de la SuSy a las membranas (Koch, 2004).

La fosforilación de la enzima además de modular su actividad también es una señal para su ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma (Hardin et al., 2003; Kouchi et al., 1999; Varkonyi-Gasic et al., 2002).

En lo que se refiere a la actividad de las VIN, estas pueden regularse por compartimentalización y degradación por proteasas, y se ha reportado que en el control de la actividad de las VIN y CWIN es importante la participación de proteínas inhibidoras (Ruan et al., 2010).

En la Figura 10 se describe la regulación de la VIN. Pueden observarse vesículas que almacenan precursores de proteasas (PPV), que concentran las VIN y las enzimas de procesamiento vacuolar (VPE), que posteriormente son liberadas en las vacuolas. Este mecanismo permite regular la actividad de las VIN en las vacuolas y su degradación por las VPE (Koch 2004).

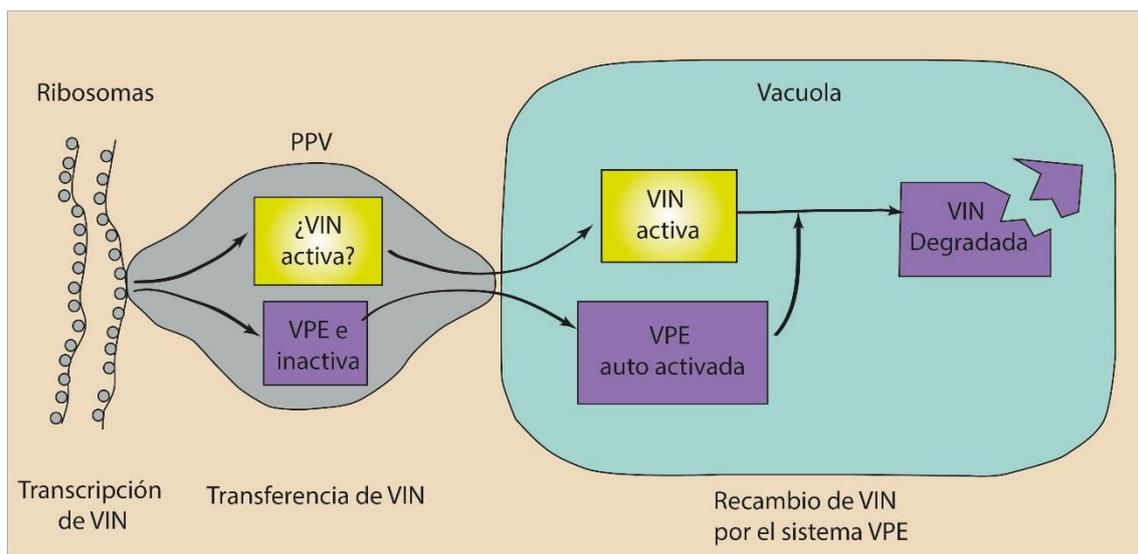


Figura 10. Compartimentalización vacuolar (Koch, 2004).

En diversos sistemas se ha descrito que las proteínas inhibidoras que regulan la actividad las VIN y de las CWIN, son relativamente pequeñas (15-23 KDa) con una estructura muy estable (Jin et al, 2009; Ruan et al.,2010); las invertasas de pared forman asociaciones con las proteínas inhibidoras a un pH ácido (de 4 a 6), las cuales se logran disociar a valores de pH neutros. Esto remarca la importancia del pH como un mecanismo de regulación de la actividad de VIN y CWIN (Hothorn and Scheffzek, 2006).

Asimismo, mediante el silenciamiento del inhibidor de invertasas INVINH1 la actividad de la CWIN aumenta de 45 a 65% en hojas maduras y el doble en las semillas y los frutos, lo que muestra la importancia del silenciamiento en invertasas de pared. Además, se observó que los niveles de expresión de los mRNA de los genes para la CWIN no fueron afectados al silenciar al inhibidor, lo que sugiere que los inhibidores de invertasas regulan la actividad en los sitios de descarga apoplástica (entre el fruto y la semilla), permitiendo que cada semilla reciba una cantidad suficiente de carbohidratos (glucosa y fructosa) para su desarrollo, lo que aumenta el número de semillas que se desarrollan (Jin et al., 2009).

3. Antecedentes

En los frutos del frijol se ha descrito la relación entre los niveles de carbohidratos y el crecimiento de las semillas (Belmont, 2021)

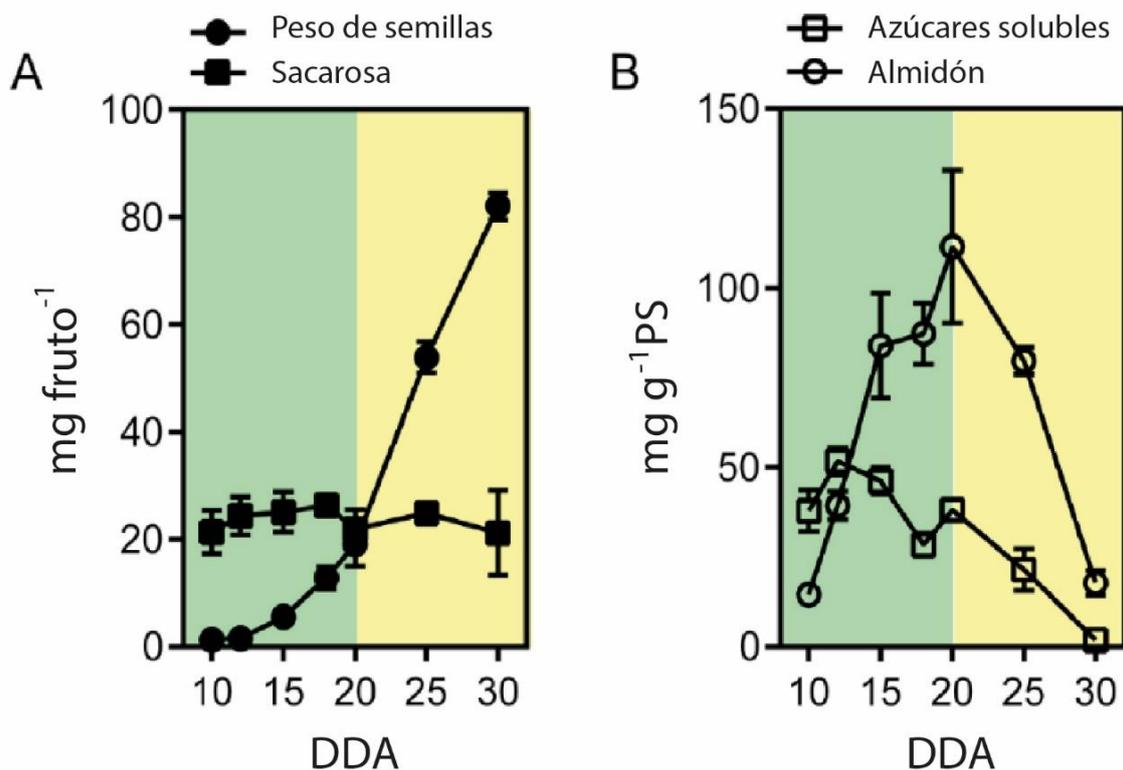


Figura 11. Cambios en los niveles de azúcares y almidón en la vaina de frijol durante el desarrollo de las semillas. A. Peso de las semillas y contenido de sacarosa B. Contenido de azúcares solubles y almidón (Belmont, 2021).

En la figura 11A se observa que los niveles de sacarosa que llegan al fruto de frijol se mantienen constantes durante el crecimiento de las semillas, no obstante, en una primera etapa (10-20 DDA) las semillas mantienen un crecimiento moderado, y a partir del día 20 el crecimiento es exponencial y seguramente sus necesidades metabólicas aumentan de la misma manera. También se observa un incremento en los niveles de azúcares solubles y almidón en el período de crecimiento moderado de la semilla (Figura 11B), y cuando se incrementa la velocidad de crecimiento estos niveles se reducen drásticamente, sugiriendo que las necesidades metabólicas de las semillas ya no son satisfechas por la actividad fotosintética de la hoja, y es necesario hacer uso de los recursos acumulados en la vaina, de modo que al entrar en esta segunda etapa de crecimiento acelerado los azúcares y el almidón almacenado son utilizados por las semillas con el propósito de lograr un desarrollo exitoso (Belmont et al., 2021).

Un análisis de los niveles de azúcares y almidón en las vainas de frijol de seis genotipos mostró variaciones que dependían del genotipo (Carmona, 2022) (Figura 12), lo que indica que cada genotipo metaboliza la sacarosa que llega al fruto de manera diferente. Sin embargo, en todos los genotipos los niveles de fructosa son los más altos.

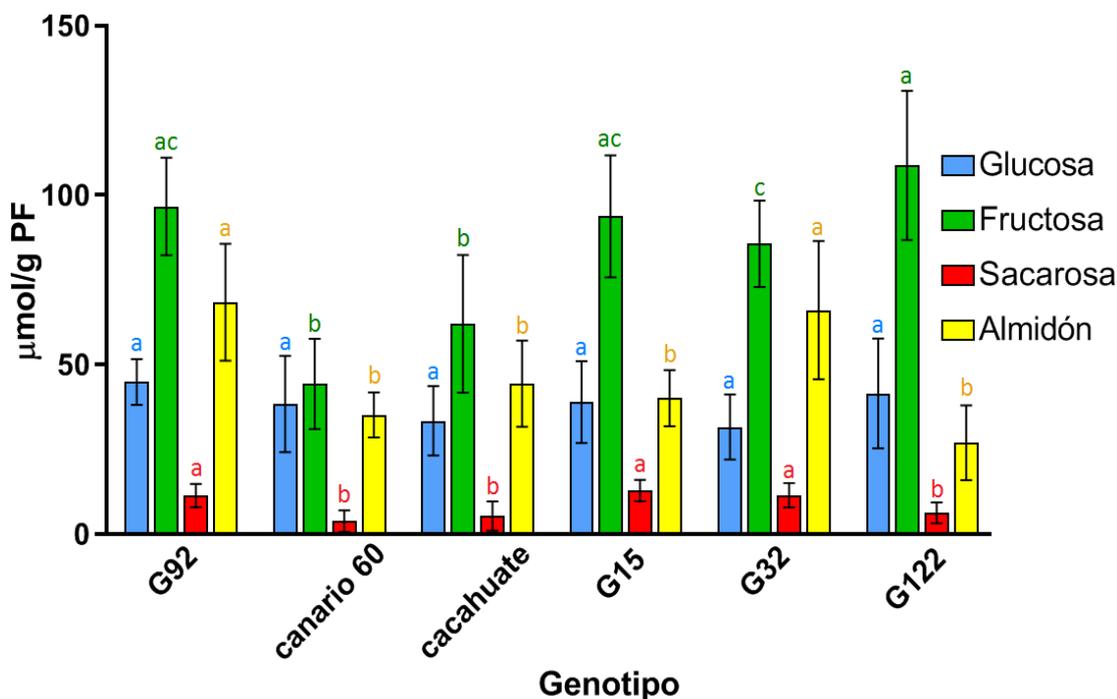


Figura 12. Evaluación de los niveles de azúcares en diferentes genotipos del fruto del frijol de 15 DDA (Carmona 2022).

Las enzimas responsables de la degradación de la sacarosa son las invertasas y la SuSy; sin embargo, los productos de la degradación son diferentes como se describió anteriormente. El hecho de que los niveles de fructosa en las vainas de los frutos de frijol sean tan elevados sugiere que la participación de ambas enzimas en el metabolismo de la sacarosa que recibe ese órgano es diferente. Se ha estudiado el transporte de nutrientes en las vainas, encontrándose que durante el periodo de antesis el fruto se comporta como un órgano de demanda que almacena nitrógeno y carbono (Rossato et al., 2001), sin embargo, el endocarpio de la vaina aporta fotoasimilados al embrión en desarrollo durante las últimas etapas de maduración de las semillas (Rochat y Boutin, 1992).

Las invertasas y los transportadores de hexosas son más activos que SuSy y se expresan más durante las primeras etapas del desarrollo del fruto (Sherson et al., 2003), mientras que la actividad de SuSy es esencial para la biosíntesis del almidón durante las últimas etapas de llenado de las semillas (Borisjuk et al., 2003; Etxeberria y Gonzalez, 2003).

4. Hipótesis

Las actividades de las invertasas vacuolar, de pared y citoplásmica, así como de la SuSy definen los niveles de glucosa y fructosa presentes en las vainas durante la primera etapa de crecimiento del fruto de frijol (10-20 DDA).

5. Objetivos

- 5.1. Estudiar la actividad específica de las invertasas (CWIN, CIN, VIN) y de la SuSy en vainas de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) durante el desarrollo de la vaina.
- 5.2. Cuantificar los niveles de sacarosa, glucosa y fructosa presentes en las vainas de frijol.
- 5.3 Evaluar la expresión de los genes que codifican para la SuSy.

6. Material y métodos

6.1 Material biológico

Se utilizó el genotipo G26 de la planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L), las semillas se desinfectaron con una solución de etanol al 70% (v/v) por un minuto y después con una solución de hipoclorito de sodio al 1% (v/v) durante 12 minutos. Se germinaron en papel saturado con agua a temperatura ambiente (23-25°C) y una vez que las semillas germinaron, las plántulas fueron sembradas en macetas con agrolita. Durante su crecimiento se les suministró de manera alternada agua y solución de Hoagland.

Las flores fueron etiquetadas con el día de la floración y los frutos se colectaron a los 10, 15 y 20 DDA; las semillas se separaron de las vainas y las vainas se cortaron en trozos pequeños, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a una temperatura de -70°C.

6.2 Análisis de la actividad enzimática

6.2.1 Preparación de los extractos de proteína

El tejido de las vainas se pulverizó en un mortero con nitrógeno líquido. Se homogeneizó en una solución amortiguadora de extracción que contenía HEPES-NaOH (pH 7.5) 100 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 10 mM, DTT 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DIECA 5 mM, inhibidor de proteasas, glicerol al 10% v/v, 0.25% Triton X-100, se centrifugó a 18000 g durante 15 minutos. La fase soluble se utilizó para medir la actividad de las invertasas solubles (VIN, CIN) y de la SuSy. La fase insoluble se lavó dos veces con la solución amortiguadora de extracción, se resuspendió en 500 µL de la solución amortiguadora de extracción adicionada con NaCl 1M, y se mantuvo en agitación rotatoria a temperatura ambiente por dos horas. Se centrifugó a 10 000 g por 10 minutos, y en el sobrenadante se midió la actividad de la CWIN.

6.2.2 Invertasas ácidas

Para medir la actividad de la CWIN y VIN se siguió la metodología descrita por Mathan et. al., (2021) con algunos cambios. Se utilizó una mezcla de reacción de 40 µL que contenía 20 µL de sacarosa 100 mM y 10 µL de acetato de sodio 200 mM (pH 4.5). La mezcla se preincubó a 37°C por 5 minutos, se adicionaron

10 μL del extracto enzimático de 10, 15 o 20 DDA y se mantuvo durante una hora a 37°C . La mezcla de reacción se calentó a 80°C por 10 min para detener la reacción.

Para cuantificar la glucosa generada se adicionaron 150 μL de una mezcla de reacción que contenía Hepes 100 mM, KCl 50 mM, MgCl_2 3 mM, ATP 1 mM, NAD 0.3 mM, y 1 U de hexocinasa. Se midió la absorbencia a 340 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan FC para cuantificar el NADH basal, se adicionaron 10 μL de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (1U), se incubó durante 30 min a 25°C y al cabo de este tiempo se realizó una segunda medición de la absorbencia a 340 nm. Los valores de absorbencia se interpolaron en una curva patrón de glucosa.

6.2.3 Invertasa neutra

En el caso de la invertasa neutra (CIN) se siguió el mismo procedimiento descrito para la determinación de las invertasas ácidas, pero modificando el pH de la reacción. La mezcla de reacción contenía 20 μL de sacarosa 100 mM y 10 μL de Hepes 100 mM (pH 7.5).

6.2.4 Sacarosa sintasa (SuSy)

Para medir la actividad de SuSy en la vía de degradación se siguió la metodología propuesta por Mathan et. al., (2021). Los extractos de 10, 15 y 20 DDA (50 μL) se incubaron con 150 μL de la mezcla de reacción (Hepes-NaOH 20 mM (pH 7.5), sacarosa 100 mM, UDP 2 mM, MgCl_2 2 mM, UDPGDH 0.005 U y NAD^+ 1.5 mM). El incremento de absorbencia se midió de forma continua a 340 nm en un intervalo de 0-30 min a 25°C en el espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan FC. La actividad de invertasa se calculó como la cantidad de NAD^+ reducido por minuto por mg de proteína empleando la ecuación de Lambert-Beer.

6.3 Cuantificación de proteínas

Para cuantificar la proteína se utilizó el método de Bradford (1976) y los datos se interpolaron en una curva patrón realizada con albúmina sérica bovina (BSA) 0.5 mg/ μL .

6.4 Extracción de RNA

El tejido (aproximadamente 500 mg) se pulverizó en un mortero con nitrógeno líquido y se homogeneizó con 5 mL de reactivo de “TRIzol Reagent”. Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación del complejo nucleoproteico. Se añadió 1 mL de cloroformo, la mezcla se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g a 4°C. Se tomó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo de centrifuga. Se adicionaron 2.5 mL de isopropanol y se incubaron durante 10 minutos a 4°C, se centrifugó a 12000 g a 4°C. La pastilla se lavó con 5 mL de etanol al 75%, se descartó el sobrenadante y se dejó evaporar el etanol residual. Se resuspendió la pastilla en 50 µL de agua libre de RNAsas. Se verificó la integridad del RNA en un gel de agarosa al 2% y se cuantificó en un espectrofotómetro BioDrop.

6.5 Síntesis de cDNA

A partir del RNA extraído se realizó la síntesis de DNA complementario (cDNA), para ello se utilizó el kit NZYRT 2x Master Mix (NZYtech) y se siguieron las instrucciones del proveedor. EL cDNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.6 RT-PCR

Se prepararon 10 µL de una mezcla de reacción con los siguientes componentes: 5 µL Dream Taq Hot Star (Thermo Scientific), 0.5 µL de la mezcla de oligos, 2 µL de cDNA y 2.5 µL de H₂O libre de RNAsas.

Para realizar la PCR se utilizaron las condiciones de la tabla 1.

Tabla 1. Ciclo de temperaturas empleadas en la PCR

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Inicio	95	3
Desnaturalización	95	0.5
Alineamiento	59	0.5
Elongación	72	1
Elongación final	72	5

} 30 ciclos

Para corroborar la amplificación del cDNA se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en 30 mL de TAE (Tris HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM).

6.7 Inmunodetección de SuSy

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, (SDS-PAGE) al 10% de acrilamida: bis acrilamida (Tabla 2). La electroforesis se corrió a 100 V hasta que el frente de corrida alcanzó el borde del gel. Las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF), durante 1 hora y 15 minutos a 100 V, con una solución de transferencia (pH 8.3), Tris 25 mM, metanol al 20%, Glicina 96 mM, SDS 0.0025%. Posteriormente la membrana se incubó una hora en una solución de leche descremada al 5% (p/v) en el amortiguador TBST (Tris-HCl 10mM, pH 7.6, NaCl 0.14M, Tween 20 al 0.1%), se añadió el anticuerpo primario anti-sacarosa sintasa diluído en una proporción 1:20000 y se incubó a 4°C durante toda la noche en agitación constante. Se realizaron cuatro lavados con TBST, de 15 minutos cada uno, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario en TBST en una dilución 1:20000 y se mantuvo en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó cuatro veces con TBST por 15 minutos cada vez. Por último, se realizó la reacción con el producto Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate de Millipore que permite determinar la luminiscencia emitida por el anticuerpo secundario en el equipo ChemiDoc (BioRad).

Tabla 2. Soluciones usadas para la elaboración del gel apilador y el gel separador

Gel apilador		Gel separador	
Acrilamida: Bisacrilamida	30%;0.8%	Acrilamida: Bisacrilamida	30%;0.8%
Amortiguador Tris-HCl	pH 6.8 (4x) 0.5M	Amortiguador Tris-HCl	pH 8.8 (8x) 3M
SDS	20% (p/v)	SDS	20%(p/v)
Persulfato de amonio	10%	Persulfato de amonio	10%

6.8 Electroforesis en gel de agarosa para cDNA

Se preparó un gel de agarosa al 1.5% o 2% (p/v) con 30 mL de TAE (Tris HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) y 4 µL del colorante para ácidos nucleicos Gel Star de Lonza (Cat. #50535). A las muestras se les agregó amortiguador de muestra 6X de Thermo Scientific (Cat. # R1161) y la electroforesis se corrió a 100 V hasta tener una separación definida de las muestras (aproximadamente 20 minutos).

6.9 Análisis bioinformático

Para hallar las secuencias de los genes que codifican para SuSy e invertasas en la planta de frijol, primero se realizó una búsqueda de las secuencias de genes que codifican para ambas enzimas en la base de datos en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) en *Arabidopsis thaliana*, a partir de estas secuencias encontradas se llevó a cabo una segunda búsqueda de las secuencias homólogas de ambas enzimas presentes en la planta de frijol, para este propósito se empleó la herramienta Blast en la base de datos de Phytozome; Se encontraron ocho secuencias para SuSy y tres secuencias para invertasas, posteriormente con las secuencias homólogas se diseñaron los oligonucleótidos (primers) para hacer las PCRs aplicando el programa Primer3Plus. Así mismo se diseñó un árbol filogenético a través de un alineamiento de las secuencias con el programa Clustal Omega.

7. Resultados

7.1 Cuantificación de glucosa y fructosa en vainas de frijol de 10, 15 y 20 DDA

Se midieron las cantidades de glucosa y fructosa en las vainas de frijol de 10, 15, y 20 DDA. En la Figura 13 se puede apreciar que la cantidad de glucosa descende a medida que la vaina completa su desarrollo, mientras que los niveles de fructosa se incrementan.

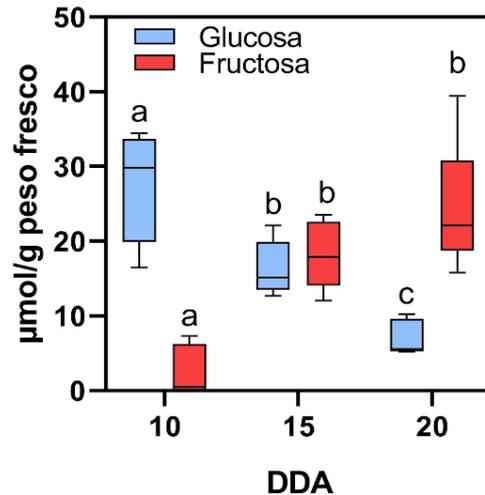


Figura 13. Contenido de azúcares en las vainas de frijol de 10,15 y 20 DDA. Los bigotes de las barras representan el valor de la media +/- el valor de la DE. Las barras con diferente letra indican que existe diferencia significativa respecto a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

7.2 Actividades enzimáticas en las vainas de los frutos de frijol de 10, 15 y 20 DDA

7.2.1. Actividad de las invertasas

En general se observa que la actividad de las invertasas es más alta cuando los frutos están iniciando su desarrollo para posteriormente reducirse. Sin embargo, como se presenta en la Figura 14 A, la actividad de la invertasa neutra se mantiene con poco cambio de los 10 a los 15 DDA, y baja más a los 20 DDA. La actividad de la invertasa ácida (vacuolar) es la que predomina en este tejido, y se observa que es hasta 40 veces más alta que la invertasa neutra y de pared. Además, de que desciende de manera drástica de los 10 a los 15 días y prácticamente llega a cero a las 20 DDA (Figura 14 B). La actividad de la invertasa de pared a los 10 días es menor que la actividad de la invertasa ácida, pero es prácticamente el doble que la neutra y como se muestra en la Figura 14 C se reduce considerablemente en las vainas de 15 DDA.

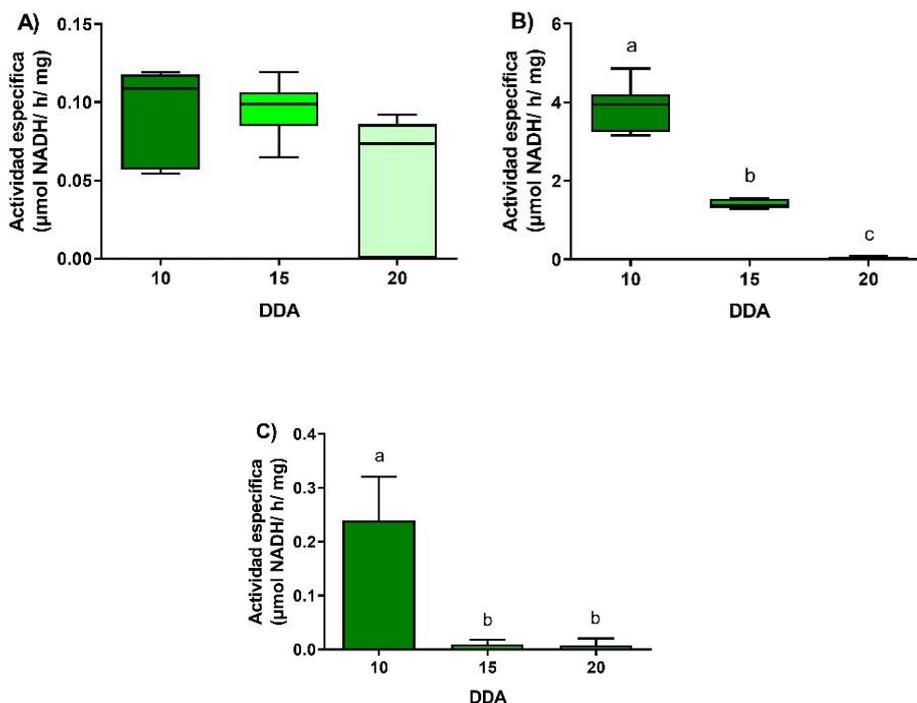


Figura 14. Actividad enzimática de las invertasas en vainas de frijol de 10,15 y 20 DDA. A) Invertasa citosólica (neutra) B). Invertasa vacuolar (ácida) C). Invertasa de pared. Los bigotes de las barras representan el valor de la media +/- el valor de la DE. Las barras con diferente letra indican que existe diferencia significativa respecto a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

7.2.2. Actividad de la SuSy

La actividad de SuSy aumentó en las vainas de frijol durante el transcurso de los días evaluados 10, 15 y 20 DDA (Figura 15).

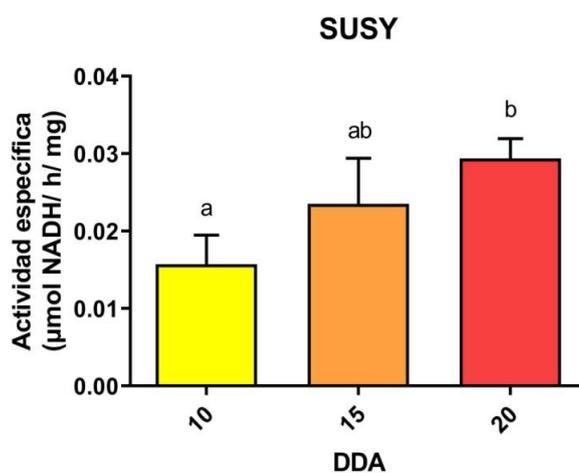


Figura 15. Actividad de la enzima SuSy en vainas de frijol de 10,15, 20 DDA. A 15 DDA no se presenta diferencia significativa. Los bigotes de las barras representan el valor de la media +/- el valor de la DE. Las barras con diferente letra indican que existe diferencia significativa respecto a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

7.3 Inmunodetección de la SuSy

Con el propósito de conocer si el incremento en la actividad de la SuSy respondía a un incremento en la cantidad de proteína, se realizó la inmunodetección de esta enzima. En la Figura 16A se presenta la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) teñida con rojo de Ponceau que muestra la distribución de proteínas. En el western-blot (Figura 16B) se puede observar que la cantidad de proteína se incrementa considerablemente a medida que los frutos se desarrollan, y a 20 DDA se aprecia claramente una mayor intensidad de la banda de 90 KDa, que corresponde a SuSy.

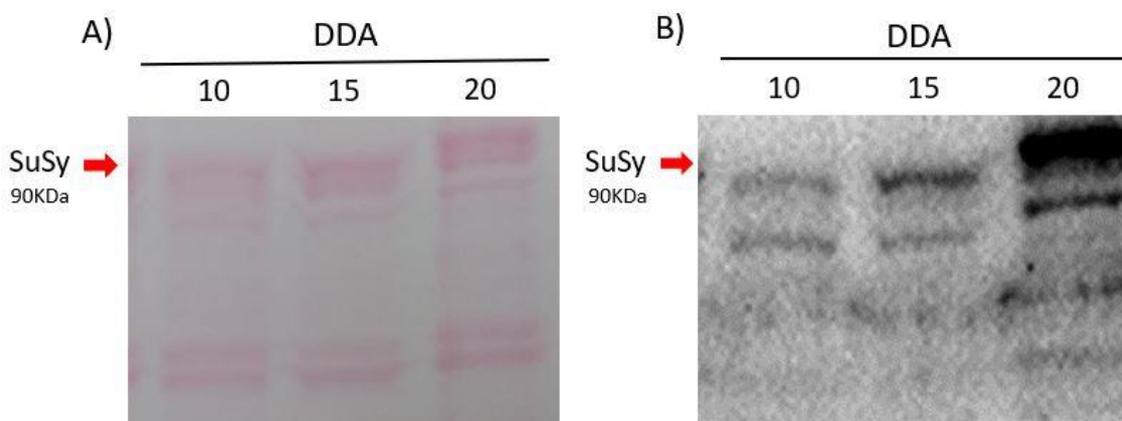


Figura 16. Inmunodetección de la SuSy presente en las vainas de frijol a los 10, 15 y 20 DDA. A. Tinción de la membrana con rojo de Ponceau. B. Western-blot de la SuSy. Las flechas en rojo señalan el valor de 90 KDa que corresponde al valor de SuSy.

7.4 Análisis de la expresión de los genes de la SuSy en las vainas de frijol de 10, 15 y 20 DDA

Para analizar la expresión de los genes que codifican para las invertasas y para la SuSy, se hizo una búsqueda *in silico* de los genes presentes en frijol. Una vez identificados los genes en frijol también se hizo un análisis en la base de datos de Phytozome de los niveles de expresión en las vainas. En la Figura 17 se presenta un mapa de calor con la expresión de los 8 genes que se identificaron para SuSy, en una escala relativa en donde se puede apreciar que solamente tres de estos genes Phvul.003G127500, Phvul.009G223800.1 y Phvul.001G209600 se expresan en vainas maduras y dos Phvul.003G127500 y Phvul.009G223800 en vainas jóvenes.

En el caso de las invertasas se encontraron tres genes (Phvul.002G061200, Phvul.003G217900 y Phvul.005G008200) que codifican para invertasas vacuolares, sin embargo, se reporta que no presentan expresión en vainas de frijol.

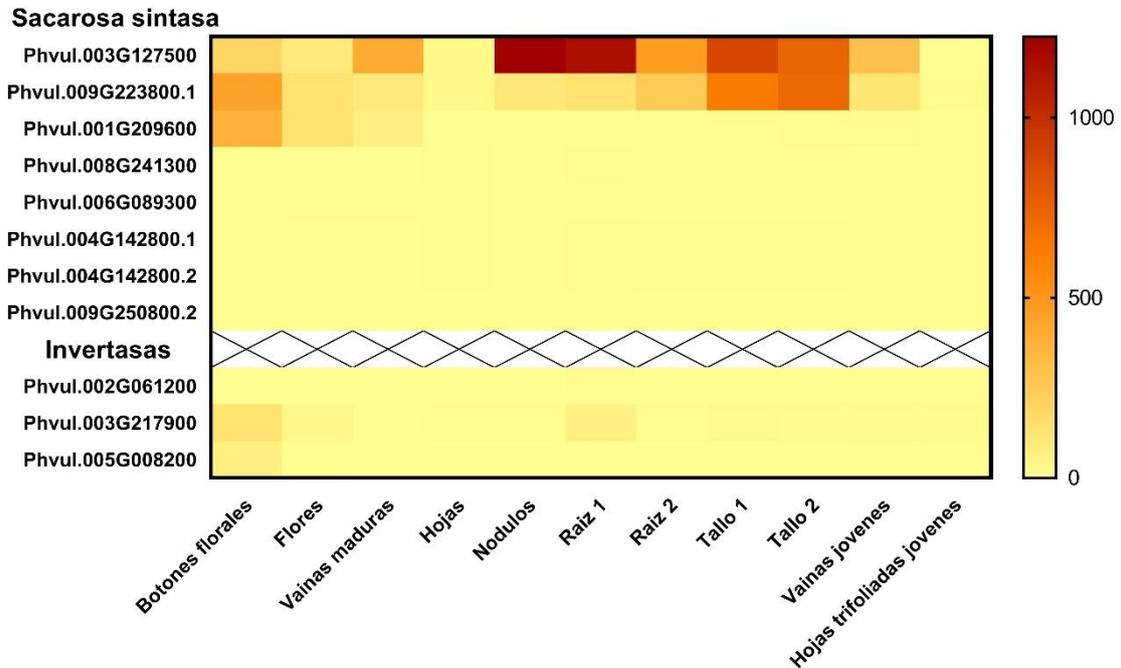
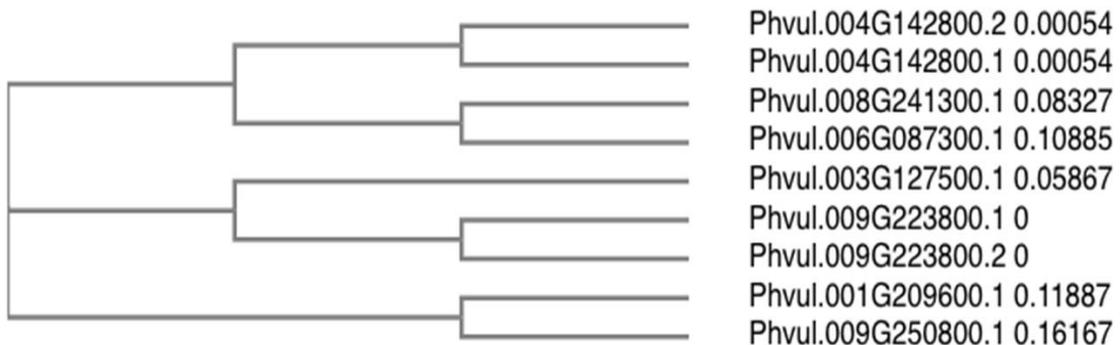


Figura 17. Expresión de los genes que codifican para SuSy e invertasas en diferentes partes de la planta de frijol. (Joint Genome Institute, 2023)

La Figura 18 muestra un árbol filogenético con las ocho secuencias evaluadas de SuSy (A) y las tres de invertasas (B), esta figura nos indica que los cambios en la expresión de estos genes no se relacionan filogenéticamente.

A) Genes evaluados de la SuSy



B) Genes evaluados de invertasas

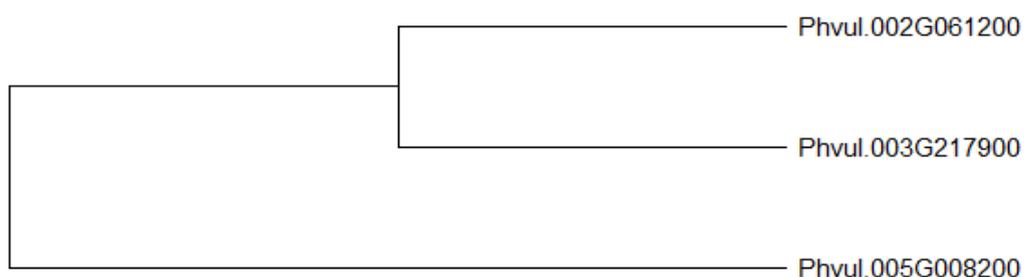


Figura 18. Árbol filogenético de los genes homólogos de SuSy (A) e invertasas (B)

Con el objetivo de evaluar la expresión de los genes de la SuSy en la vaina del fruto del frijol, se hizo un análisis mediante RT-PCR. Con este propósito se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla 3). Se realizó la extracción de RNA de las vainas de frutos de frijol de 10, 15 y 20 DDA, se cuantificó y se verificó su integridad (Figura 19).

Tabla 3. Oligonucleótidos que se diseñaron para evaluar la expresión de la SuSy

Sacarosa sintasa (SuSy)					
Nombre		Secuencia 5' 3'	pb	Amplicon (pb)	Tm (°C)
Phvul.003G127500	Fw Rv	TGGAAATGGTGTGCAGTTCC TTCCAAAAGTGGGTGCAAGC	20 20	82	58.7 59.5
Phvul.009G223800.1	Fw Rv	AGTGCTGCCACCTTTTGTG TCATCAACAGCAAGCACGTG	20 20	93	59.5 59.4
Phvul.001G209600	Fw Rv	TGCCAGTCAAATTGCTGCTG TGCTTCTCAAGTGCATGCG	20 20	142	59.7 58.8
Phvul.008G241300	Fw Rv	CAAGTGCGTGCTTTAGAGAAGG TGCAAGTTGTCCCTTTTGCC	22 20	118	59.8 59.5
Phvul.006G087300	Fw Rv	TCCACCATACGTTGCCTTTG TCGGTTGCCCATTTTTGTC	20 20	150	58.5 59.4
Phvul.004G142800.1	Fw Rv	TGGGCAAACGATGAAAACGC CGTTTCCCGCTAAACCTTGAAG	20 22	76	60.3 60.1
Phvul.004G142800.2	Fw Rv	TGCAAGGCCTTGATGTGAAG TTGCATGTGGTTCCTTTGTC	20 20	140	58.8 59.6
Phvul.009G250800.2	Fw Rv	TTGCATTGCAGTGGTGAAGG TGAATGGCCATGCAAAGC	20 20	116	59.3 60

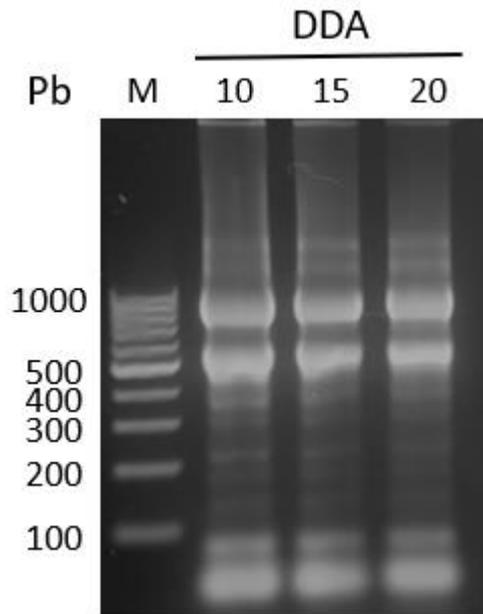


Figura 19. RNA purificado de vainas de frijol de 10,15 y 20 DDA

Para asegurar que se disponía de la misma cantidad de cDNA en cada una de las reacciones se realizó un control de carga con actina (Figura 20).

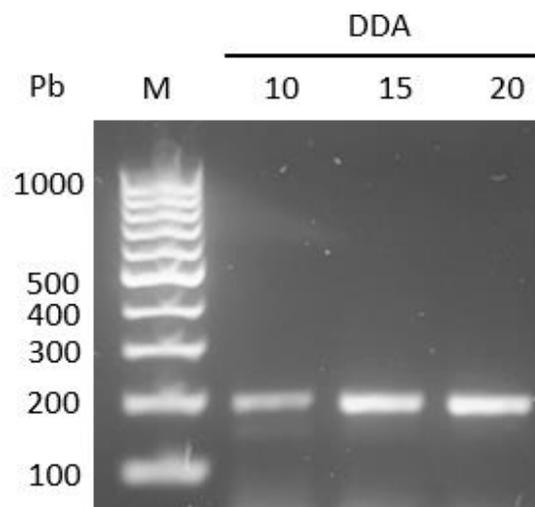
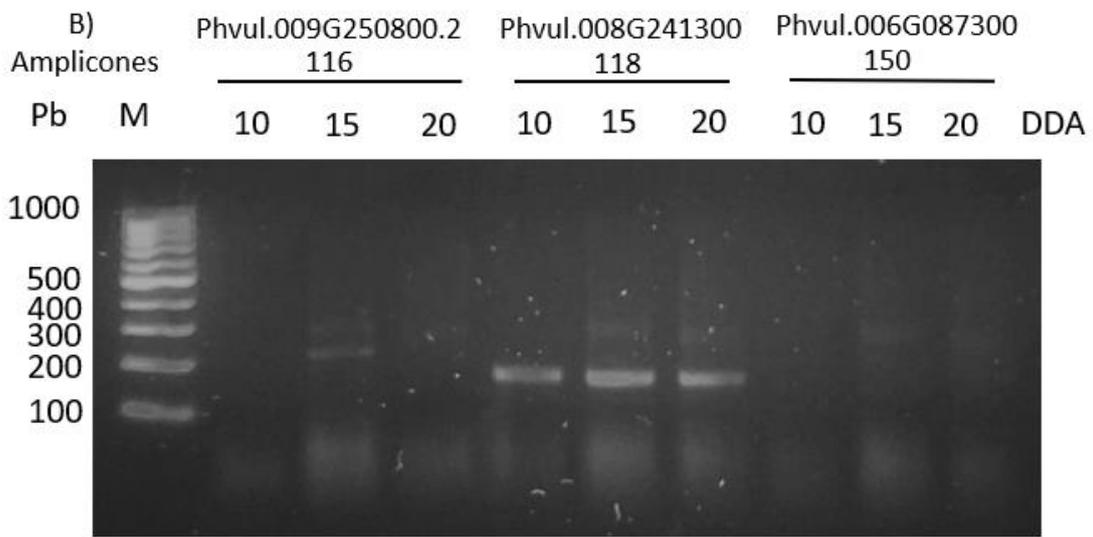
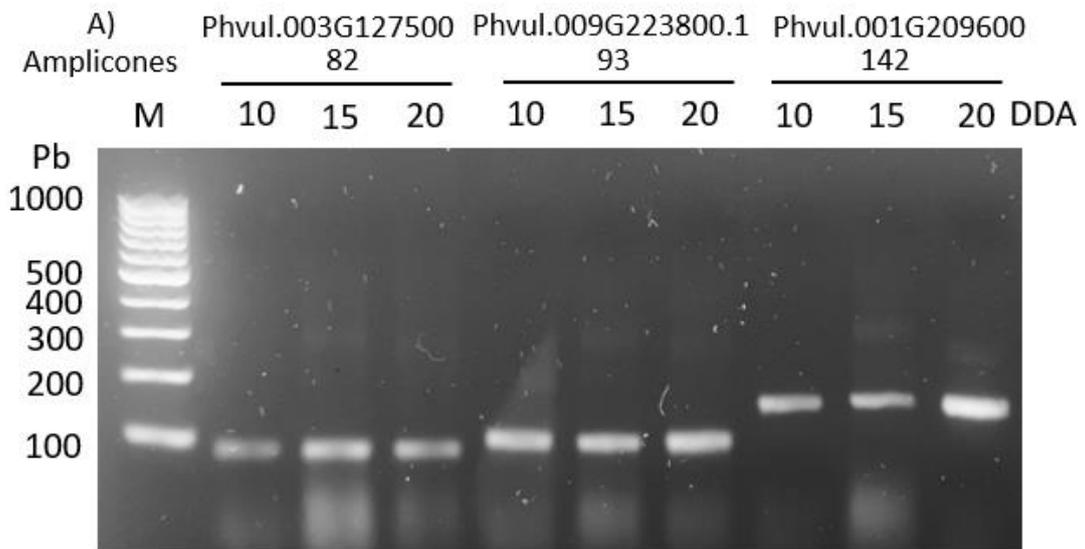


Figura 20. Control de carga de RNA para el análisis de la expresión de genes

En la Figura 21 se presentan los resultados del análisis de la expresión de los genes de SuSy en las vainas de frijol de 10, 15 y 20 DDA. Es importante mencionar que el tamaño de los productos de las PCRs corresponde al tamaño esperado de acuerdo con los oligos que se diseñaron. De los ocho genes que se analizaron solo Phvul.009G250800.2 y Phvul.006G087300 no amplificaron (Figura 21B), sugiriendo que no se expresan en las vainas de frijol de 10, 15 y

20 DDA. Los genes Phvul.003G127500, Phvul.009G223800.1, Phvul.008G241300 no mostraron cambio en su expresión (Figura 21A, 21B), Phvul.001G209600 presenta un incremento durante el desarrollo de la vaina (Figura 21A) mientras que Phvul.004G142800.1 y Phvul.004G142800.2 muestran un aumento en su expresión a los 15 DDA y posteriormente una ligera disminución en su expresión a 20 DDA (Figura 21C).



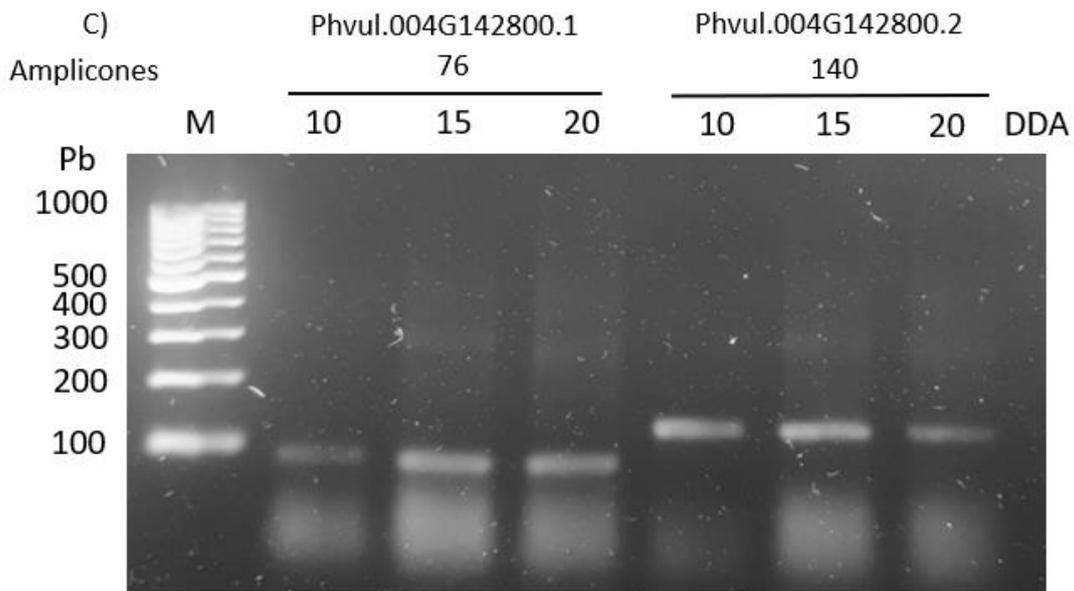


Figura 21. Expresión de los genes de la SuSy en vainas de frijol de 10, 15 y 20 DDA

8. Discusión de resultados

La producción de fotosintatos y su distribución entre los diferentes órganos de las plantas es determinante para su desarrollo y éxito reproductivo. Así, durante el crecimiento de las plantas, las raíces demandan mucho carbono, pero cuando la planta transita a la etapa reproductiva los órganos florales, los frutos en desarrollo y la semilla, serán los órganos con mayor fuerza de demanda. Como respuesta a estas necesidades, las plantas han desarrollado mecanismos para almacenar y transportar el carbono (Mac Neill et al., 2017). La sacarosa es un metabolito clave en la distribución de carbono, sin embargo, no participa directamente en los procesos de desarrollo, tiene que ser convertida en glucosa y fructosa para satisfacer las necesidades de los tejidos que la demandan. De tal manera que la capacidad de cada órgano para metabolizar sacarosa tiene una relación directa con la cantidad de sacarosa que reciben.

En este trabajo se analizó cómo se modifican los niveles de glucosa y fructosa presentes en las vainas durante el desarrollo del fruto del frijol. En la Figura 13 se pueden apreciar los niveles de estos azúcares, y de manera interesante se observa que mientras los niveles de glucosa se reducen de manera significativa, los de fructosa se incrementan. Estos resultados sugieren que no solo es la actividad de las invertasas la que determina este comportamiento, pues si esto

fuera así, la tendencia en los cambios de los niveles de estos azúcares sería similar. Dado que la sacarosa puede metabolizarse a través de la actividad de las invertasas en glucosa y fructosa o bien por la SuSy en UDP-glucosa y fructosa, se analizaron las actividades de estas enzimas. Al inicio del desarrollo del fruto la actividad enzimática de las invertasas es elevada, ésta catálisis explica las altas cantidades de glucosa producidas a 10 DDA, no obstante durante los días posteriores, la actividad de invertasas disminuye (Figura 14), lo cual se ve reflejado en una reducción en los niveles de glucosa, mientras que la actividad de SuSy incrementa conforme transcurre el desarrollo de los frutos, de modo que a 20 DDA su actividad es mayor, lo que explicaría el perfil de azúcares para este día, en donde la cantidad de fructosa en la vaina alcanza el nivel más alto. Sin embargo, es importante considerar otros factores que también afectan los niveles de azúcares como su uso y almacenamiento, a los 10 DDA los niveles de glucosa son más altos en relación a fructosa cuando se esperaría que por la actividad de las invertasas se almacenaran cantidades similares de fructosa y de glucosa; lo que sugiere que durante esta etapa la fructosa podría ser metabolizada por otras enzimas como las fructocinasas, que a su vez están relacionadas con la formación de los frutos durante esta primera etapa del desarrollo de las vainas (Stein y Granot, 2018).

El comportamiento obtenido para las actividades enzimáticas de la INV y la SuSy también ha sido reportado en diferentes especies de plantas, como en el caso de *Solanum lycopersicum* o *Arabidopsis thaliana* (Ruan et al., 2010), una posible explicación es que a largo plazo las plantas metabolizan sus azúcares mediante la SuSy en lugar de emplear a las invertasas, pues de esta manera el costo energético para su respiración es menor, debido a que uno de sus productos, la UDP-glucosa no requiere ser fosforilada para integrarse en el metabolismo a diferencia de las hexosas que requieren de ATP para fosforilarse y entrar a la glucólisis, de esta manera se mantiene una vía de respiración que conserva ATP (Koch 2004), además la SuSy tiene la capacidad de minimizar la señalización por hexosas, particularmente durante períodos en donde estas señales alteran los procesos para la diferenciación o la maduración (Wobus y Weber 1999).

Con relación a la cantidad de SuSy presente en las vainas (Figura 16B), se observa que, aunque la cantidad de proteína y la respuesta en la actividad de

SuSy (Figura 15), aumentan progresivamente hasta obtener una mayor cantidad de proteína y actividad a los 20 DDA, la cantidad de proteína es mucho más alta en comparación con la actividad. Durante esta etapa se esperaba una mayor actividad, dado que al final los niveles de fructosa son tan altos como los niveles de glucosa al inicio del desarrollo (10 DDA), además los resultados indican que la SuSy es la única enzima que presenta actividad a los 20 DDA, una posible explicación es que esta enzima se encuentre regulada a nivel traduccional y postraduccional, y se ha reportado que su estado de fosforilación es un factor principal para regular su actividad, y es necesario que la enzima este monofosforilada para que sea activa, esta modulación está regulada por enzimas como la proteína cinasa dependiente del calcio (CDPK's o SnRK's), y al ser fosforilada es protegida por proteínas conocidas como ENOD40 que se unen a ella evitando que se fosforile por segunda ocasión y sean marcadas por ubiquitinas para su posterior degradación por el proteosoma, (Winter et al., 2003). En resumen, su alta regulación a nivel postraduccional podría indicar que una parte de SuSy se encuentre inactiva a los 20 DDA.

De acuerdo con la base de datos Phytozome, los genes Phvul.003G127500, Phvul.009G223800.1 y Phvul.001G209600 que codifican para SuSy, son los que mantienen un mayor nivel de expresión en las vainas maduras y jóvenes (Figura 17), lo cual también se puede apreciar en nuestros resultados, que muestran que la expresión de estos genes es mayor con relación a la de los demás genes analizados. De los tres genes Phvul.001G209600 es el único que presentó un incremento en la expresión de sus mensajes, lo que sugiere que es un gen que es regulado a nivel transcripcional durante el crecimiento de las vainas (Figura 21A) y que podría estar involucrado en el incremento de la actividad de SuSy.

9. Conclusiones

- Las invertasas presentan mayor actividad al inicio del desarrollo (10 DDA) lo cual favorece el aumento de azúcares solubles en la vaina.
- Las invertasas con mayor actividad corresponden a las invertasas de vacuola.
- La actividad de SuSy se incrementa conforme se lleva a cabo el crecimiento de la vaina.
- El gen Phvul.001G209600 que codifica para SuSy se regula a nivel transcripcional y podría estar relacionado con el incremento de la actividad de SuSy.
- Los resultados sugieren que el perfil de azúcares en la vaina de frijol depende en gran medida del balance en las actividades enzimáticas de las invertasas (VIN, CWIN y VIN) y de la SuSy.

10. Perspectivas

- Estudiar las isoformas de SuSy y analizar las modificaciones postraduccionales que regulan su actividad enzimática en la planta de frijol.

11. Referencias

Adams M. 1977. An estimation of homogeneity in crop plants with specific reference to genetic vulnerability in the dry bean. *Phaseolus vulgaris* L. *Euphytica* 26:665-679.

Alda F. 2010. Anatomía y fisiología vegetal III. Estructuras implicadas en el transporte. [En línea]. Disponible en: <http://b-log-ia20.blogspot.com/2010/12/anatomia-y-fisiologia-vegetal-iii.html> [Último acceso el 29 de diciembre 2022].

Amor Y, Haigler CH, Johnson S, Wainscott M, Delmer DP. 1995. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc Nat Acad Sci USA*. 92:9353-9357.

Arias JH, Rengifo T, Jaramillo M. 2007. Manual Técnico: Buenas prácticas agrícolas (BPA) en la producción de frijol voluble. [En línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a1359s/a1359s.pdf> [Último acceso el 29 de diciembre 2022].

Belmont R, Bernal GL, Padilla CD, Coello P, Martínez BE. 2021. Starch accumulation in bean fruit pericarp is mediated by the differentiation of chloroplast into amyloplasts. *Plant Science* 316 doi: 10.1016/j.plantsci.2021.111163.

Bioinformatics. 2022. Primer3Plus. [En línea]. Disponible en: <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> [Último acceso el 28 de diciembre 2022].

Bologa KL, Fernie AR, Leisse A, Loureiro ME, Geigenberger P. 2003. A bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers. *Plant Physiology* 132, 2058–2072.

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, 503–512.

Broughton WJ. 2003. “Beans (*Phaseolus* Spp.) Model food legumes”, *Plant and Soil*, Vol. 252, No. 1, pp. 55-128.

Carmona PE. 2022. Análisis de la importancia de la fosforilación de hexosas para la acumulación de carbohidratos en vainas de frutos de frijol. Tesis UNAM [En línea]. Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2023/febrero/0835537/Index.html> [Último acceso el 12 de mayo 2023].

CEDRSSA. 2020. Mercado del frijol, situación y prospectiva. [En línea]. Disponible en:

<http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/53Mercado%20del%20frijol.pdf> [Último acceso el 17 de marzo 2023].

Chen LQ, Qu XQ, Hou BH, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB. 2012. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* 335, 207–211.

Díaz MF. 1990. Crecimiento de la vaina y semillas del frijol. *Turrialba* vol 40(4): 553 -561.

EMBL's European Bioinformatics Institute. 2023. Clustal Omega [En línea]. Disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> [Último acceso el 12 de enero 2023].

Etxeberria E, Gonzalez P. 2003. Evidence for a tonoplast-associated form of sucrose synthase and its potential involvement in sucrose mobilization from the vacuole. *Journal of Experimental Botany* 54, 1407–1414.

Eveland AL, Jackson DP. 2012 Sugars, signalling, and plant development. *Journal of Experimental Botany* 63, 3367–3377.

Fernández F. 1986. Etapas de desarrollo de la planta de frijol común. CIAT pp. 6-20.

Graham PH. y Vance CP. 2012 “Legumes: Importance and constraints to greater use”, *Plant Physiology*, 131(3):872-877, <http://dx.doi.org/10.1104/pp.017004>.

Granot D, Kelly G, Stein O, David-Schwartz R. 2014. Substantial roles of hexokinase and fructokinase in the effects of sugars on plant physiology and development. *Journal of Experimental Botany* 65, 809–819.

Hardin SC, Tang GQ, Scholz A, Holtgraewe D, Winter H, Huber SC. 2003 Phosphorylation of sucrose synthase at serine 170: occurrence and possible role as a signal for proteolysis. *Plant Journal* 35:588-603.

Herbers K, Sonnewald U. 1998. Molecular determinants of sink strength. *Current Opinion in Plant Biology* 1:207–216.

Hernández-López VM, Vargas-Vázquez MLP, Muruaga-Martínez JS, Hernández-Delgado S, Mayek-Pérez, N. (2013). Origen, domesticación y diversificación del frijol común: Avances y perspectivas. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(2), 95-104. Recuperado el 31 de enero de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000200002&lng=es&tlng=es.

Hothorn M, Scheffzek K. 2006. Multiple crystal forms of the cell-wall invertase inhibitor from tobacco support high conformational rigidity over a broad pH range.

Acta. Cryst. D. 62, 665–670

Huber SC. 1983. Role of sucrose-phosphate synthase in partitioning of carbon leaves. *Plant Physiology* 71:819-821.

ITIS 2014, "ITIS standard report page: *Phaseolus vulgaris*, Taxonomic Serial No.: 26857", Integrated Taxonomic Information System, www.itis.gov (último acceso 7 October 2022).

Jin Y, Ni DA, Ruan YL. 2009. Posttranslational elevation of cell wall invertase activity by silencing its inhibitor in tomato delays leaf senescence and increases seed weight and fruit hexose level. *Plant Cell* 21:2072.

Joint Genome Institute. 2023. Phytozome. [En línea]. Disponible en: <https://phytozome-next.jgi.doe.gov/> [Último acceso el 3 de enero 2023].

Kalt-Torres W, Kerr P.S, Usuda H, Huber S.C. 1987. Diurnal changes in maize leaf photosynthesis: I. Carbon exchange rate, assimilate export rate, and enzyme activities. *Plant Physiology* 83, 283–288.

Kaplan L, Lynch TF. 1999, "Phaseolus (Fabaceae) in archaeology: AMS radiocarbon dates and their significance for pre-Colombian agriculture", *Economic Botany*, 53(3):261-272. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02866636>.

King SP, Lunn JE, Furbank RT. 1997. Carbohydrate content and enzyme metabolism in developing canola siliques. *Plant Physiology* 114, 153–160.

Koch K. 2004. Sucrose metabolism: Regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3), 235-246. doi: 10.1016/j.pbi.2004.03.014.

Kouchi H, Takane K, So RB, Ladha JK, Reddy PM. 1999 Rice ENOD40: isolation and expression analysis in rice and transgenic soybean root nodules. *Plant Journal* 18:121-129.

Lastdrager J, Hanson J, Smeekens S. 2014. Sugar signals and the control of plant growth and development. *Journal of Experimental Botany* 65, 799–807.

MacNeill GJ, Mehrpouyan S, Minow MA, Patterson JA, Tetlow IJ, Emes MJ. 2017. Starch as a source, starch as a sink: The bifunctional role of starch in carbon allocation. *Journal of Experimental Botany* 68(16):4433-4453. doi:10.1093/jxb/erx291.

Mathan J, Singh A, Ranjan A. 2021. Sucrose transport and metabolism control carbon partitioning between stems and grain in rice. *Journal of Experimental Botany* 72(12) 4355-4372.

McClellan PE, Myers JR, Hammond JJ. 1993. Coefficient of parentage and cluster analysis of North American dry bean cultivars. *Crop Science* 33:190-197.

Porch T. 2013, "Use of wild relatives and closely related species to adapt common bean to climate change", *Agronomy*, 3(2):433-461, <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy3020433>

Rennie EA, Turgeon R. 2009. A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106, 14162-14167.

Rochat C, Boutin JP. 1992. Temporary storage compounds and sucrose starch metabolism in seed coats during pea seed development. *Physiologia Plantarum* 85: 567–572.

Roitsch T, Ehne SR, Goetz M, Hause B, Hofmann M, Sinha AK. 2000. Regulation and function of extracellular invertase from higher plants in relation to assimilate partitioning, stress responses and sugar signaling. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27:815-825.

Rossato L, Laine P, Ourry A. 2001. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *Journal of Experimental Botany* 52: 1655–1663.

Ruan YL, Jin Y, Yang YJ, Li GJ, Boyer JS. 2010. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: Roles in development, yield potential, and response to drought and heat. *Molecular Plant* 3(6):942-955, <https://doi.org/10.1093/mp/ssq044>.

Sherson SM, Alford HL, Forbes SM, Wallace G, Smith SM. 2003. Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 54, 525–531.

SIAP. Servicios de Información Agroalimentaria y Pesquera. Planeación agrícola Nacional. 2016. México 2022 [En línea]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/255625/Planeacion_Agricola_Nacional_2017-2030- parte dos.pdf [Último acceso 28 Diciembre 2022].

Smeekens S, Ma J, Hanson J, Rolland F. 2010. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion Plant Biology* 13(3):273-278.

Stitt M, Schaewen A, Willmitzer L. 1991. Sink regulation of photosynthetic metabolism in transgenic tobacco plants expressing yeast invertase in their cell-wall involves a decrease of Calvin cycle enzymes and an increase of glycolytic enzymes. *Planta* 183:40–50.

Sonnewald U, Lerchl J, Zrenner R, Frommer W. 1994. Manipulation of sink–source relations in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* 17:649–658.

Stein O, Granot D. 2018. Plant fructokinases: Evolutionary, developmental, and metabolic aspects in sink tissues. *Frontiers in Plant Science*, 9 doi:10.3389/fpls.2018.00339.

Sturm A, Tang GQ. 1999. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Science* 4:401-407.

Tognetti JA, Pontis HG, Martínez-Noël GM. 2013. Sucrose signaling in plants: a world yet to be explored. *Plant Signaling and Behavior* 8:2316.

Turgeon R, Medville R. 1998. The absence of phloem loading in willow leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95, 12055–12060.

Ulloa JA, Rosas Ulloa P, Ramírez Ramírez JC, Ulloa Rangel BE. 2011. El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Repositorio Institucional Aramara* 4:127-134.

Varkonyi-Gasic E, White DW. 2002. The white clover enod40 gene family. Expression patterns of two types of genes indicate a role in vascular function. *Plant Physiology*, 129:1107-1118.

Voyses O, Valencia MC, Amézquita MC. 1994. Genetic diversity among Latin America Andean and Mesoamerican common bean cultivars. *Crop Science* 34:1100-1110.

Weber H, Borisjuk L, Wobus U. 1997. Sugar import and metabolism during seed development. *Trends Plant Science* 2:169-174.

Winter H, Huber SC, Hardin SC, Tang GQ, Scholz A, Holtgraewe D. 2003. Phosphorylation of sucrose synthase at serine 170: occurrence and possible role as a signal for proteolysis. *Plant Journal* 35:588-603.

Winter H, Huber JL, Huber SC. 1997. Membrane association of sucrose synthase: Changes during the grave response and possible control by protein phosphorylation. *FEBS Letter* 420:151-155.

Wittenbach VA. 1983. Effect of pod removal on leaf photosynthesis and soluble protein composition of field-grown soybeans. *Plant Physiology* 73:121–124.

Wobus U, Weber H. 1999. Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biological Chemistry*, 390:937-944.